THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE PARIS VII

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Alain RAMBACH

SUR LA REPLICATION DU BACTERIOPHAGE λ

SOUTENUE LE 30 JAN 1973 DEVANT LA

COMMISSION D'EXAMEN

M. GROS PRESIDENT

MM. BUTTIN)
JACOB) EXAMINATEURS
)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552724_0014

T H E S E

présentée

A L ' UNIVERSITE PARIS VII

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Alain RAMBACH

SUR LA REPLICATION DU BACTERIOPHAGE λ

SOUTENUE LE 30 JAN 1973 DEVANT LA

COMMISSION D'EXAMEN

M. GROS Président

MM. BUTTIN)
) Examinateurs
JACOB)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Je remercie Monsieur F. Jacob de m'avoir accueilli à l'Institut Pasteur et guidé pendant mon travail. Dans le Département de Biologie Moléculaire j'ai eu la chance de profiter d'un entourage idéal pour un débutant.

J'appris ainsi à me plier à la discipline expérimentale d'abord grâce à H. Condamine et M. Hofnung qui m'ont enseigné les méthodes de génétique bactérienne et ensuite grâce aux lambdologistes H. Eisen, Ph.Brachet, L.Pereira da Silva et P. Barrand, qui, par leur enseignement et leur collaboration, ont permis la réalisation du travail exposé ici.

C'est enfin grâce à tous les membres du Département que j'ai bénéficié d'un environnement exceptionnellement stimulant et enrichissant.

Je suis redevable à Messieurs F. Gros, G.Buttin et F. Jacob d'avoir accepté de juger ce travail.

TABLE DES MATIERES

Page

I - INTRODUCTION 5

II - MATERIEL ET METHODES 12

III - ETUDE DE MUTATIONS ALTERANT LA REPLICATION DU BACTERIOPHAGE λ PAR UN EFFET POLAIRE SUR L'EXPRESSION DE L'OPERON x O P 25

Chapitre 1 : Sélection de mutants du bactériophage λ N7 N53 CI857 qui n'ont pas d'effet létal sur la bactérie hôte et qui complémentent le bactériophage λ imm434 O P (mutants de la classe A). 25

1. Principe de la sélection. 25
2. Propriétés de la souche E.Coli(λ N7 N53 CI857) utilisée. 26
3. Obtention des mutants. 27
4. Mesure de l'expression des fonctions O, P et cro chez les mutants. 29
5. Exigence de la fonction N pour l'expression des fonctions O et P chez les mutants. 31

Chapitre 2 : Etude de l'effet du produit N sur l'expression de l'opéron x O P chez le bactériophage λ. 33

1. Hypothèse de stimulation par le produit N de l'expression de l'opéron x O P. Mesure par complémentation de la fonction O, soit en présence, soit en absence du gène N. 33
2. Discussion. 35

Chapitre 3 : Etude complémentaire des bactériophages mutants de la classe A. 37

1. Caractère conditionnel des mutants. Phénotype clair. 37
2. Localisation génétique des mutations. 38
3. Effet en position cis des mutations rA sur la transcription déclenchée au site c17. 38
4. Les RNA messagers. 42
5. Tests de dominance. 44
6. Nature des mutations. 45
7. Discusion. 48

IV - ETUDE DE MUTATIONS MODIFIANT OU ALTERANT LA REPLICATION DU BACTERIOPHAGE λ TOUT EN PERMETTANT L'EXPRESSION DE L'OPERON x O P 50

Chapitre 1 : Sélection de mutants du bactériophage λ N7 N53 CI857 qui n'ont pas d'effet létal sur la bactérie hôte et qui complémentent le bactériophage λ imm21 CI O P (mutants de la classe B et de la classe C). 50

1. Principe de la sélection. 50
2. Construction des bactériophages λ imm21 CI O29 P3 et λ imm21 CIts O29 P3. 51
3. Obtention des mutants. Classe B et classe C. 52

Chapitre 2 : Etude des mutants de la classe B. 54

1. Analyse fonctionnelle des mutants. 54
2. Mesure indirecte de complémentation des fonctions O et P en l'absence du produit N. 55
3. Réplication à l'état N^-. 59
4. Discussion. 59

Chapitre 3 : Etude des mutants de la classe C. 61

1. Analyse fonctionnelle des mutants. 61
2. La mutation défective est localisée sur le bactériophage. 63
3. Propriétés d'excision des mutants. 63
4. Les mutations rC ne sont pas complémentées par un allèle sauvage en position trans. 64
5. Expression d'une fonction tardive, le lysozyme, chez les mutants. 66
6. Production de stocks de bactériophages mutants. 68
7. Localisation des mutations. 68
8. Mesure de la densité des mutants. 72
9. Discussion. 75

Chapitre 4 : Analyse génétique des mutants de la classe C (mutants rep). 76

1. Recombinaison entre les mutants rep et λ imm21. Propriétés d'un recombinant (nommé λ imm21 rep). 76
2. Fréquence de réversion des mutants rep. 78
3. Recombinaison entre les mutants rep. 78
4. Discussion. Classes repA et repB. 79

Chapitre 5 : Etude de la réversion d'une mutation rep. 81

1. Isolement d'un bactériophage réverse (nommé λ N rep lic). Propriétés de ce bactériophage. 81

2. Croisement "en retour" du bactériophage λ N rep lic avec des souches lysogènes. Isolement d'un recombinant nommé λ N lic. 83

3. Propriétés du bactériophage λ N lic. 84

4. Construction par recombinaison d'un bactériophage nommé λ rep lic. 85

5. Propriétés du bactériophage λ rep lic. 86

6. Questions soulevées par l'existence d'une mutation particulière de λ localisée entre les marqueurs CII et O. 86

7. Sensibilité particulière du bactériophage λ rep lic chez certaines bactéries lysogènes. 89

8. Discussion. 89

V - DISCUSSION GENERALE 94

I - INTRODUCTION

En 1953, Watson et Crick proposaient la structure en double hélice de l'acide désoxyribonucléique. Cette structure permettait de concevoir que la réplication, c'est à dire la reproduction d'une molécule de DNA en deux molécules identiques, se faisait d'une façon semi conservative. Cette dernière hypothèse fut démontrée chez Escherichia coli par Meselson et Stahl (1958) et par Baldwin et Shooter (1963). Leurs résultats montraient que chaque région du chromosome est reproduite une fois et une seule pendant le temps d'une génération bactérienne. La réplication était donc nécessairement soumise à une régulation.

Le modèle de la réplication des éléments génétiques bactériens que Jacob, Brenner et Cuzin ont présenté en 1963 rendait compte de cette régulation. De plus ce modèle tenait compte du caractère circulaire des épisomes (Campbell 1962) et du chromosome bactérien (Jacob, Fuerst et Wollman 1957, Cairns 1963) et expliquait l'équirépartition du matériel génétique à chaque division cellulaire. Du point de vue structural, le DNA serait constitué en unités de réplication circulaires attachées à la membrane, appelées réplicons. Ces réplicons seraient soumis au système de contrôle positif suivant: chaque réplicon porterait le (ou les) gène de structure d'une protéine appelée initiateur. Cette protéine reconnaitrait une structure spécifique du DNA appelée réplicateur (figure 1). Le réplicateur marquerait le point de départ de la réplication. Celle ci serait déclenchée par une réaction entre l'initiateur et le réplicateur.

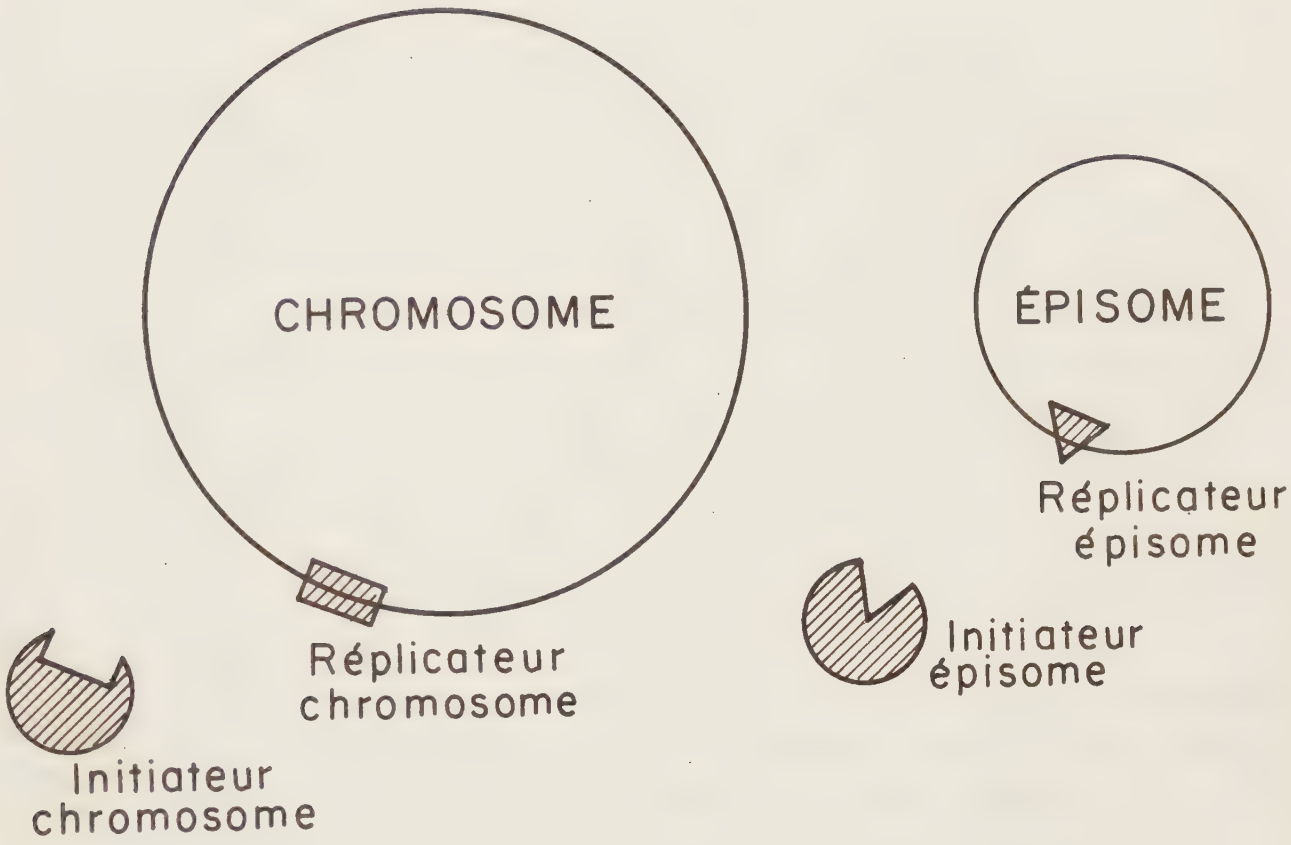


Figure 1: Représentation de deux types de réplicons d'une bactérie.

L'initiateur produit par un réplicon peut réagir spécifiquement avec le réplicateur de celui-ci.

L'étude de la réplication du chromosome bactérien a conduit à plusieurs résultats en faveur de l'existence des éléments régulateurs supposés dans le modèle du réplicon. Maaloe et Hanawalt (1961) ont découvert qu'une synthèse protéique est indispensable à la mise en route de la réplication du chromosome bactérien. D'autre part, en l'absence de synthèse protéique il devient impossible d'induire, soit par carence en thymine (Pritchard et Lark 1964), soit en utilisant des mutants thermosensibles pour la synthèse du DNA (Worcel 1970), de nouvelles réplications du chromosome. Ces exigences peuvent résulter de la nécessité de synthétiser un initiateur. L'analyse des mutants DNAA (Hirota, Ryter et Jacob 1968) offre un argument en faveur du modèle. Chez ces mutants thermosensibles, la réplication du DNA est bloquée à haute température. Cependant l'arrêt de la synthèse n'est pas immédiat. La synthèse résiduelle du DNA est de l'ordre de celle qui est obtenue après l'arrêt des synthèses protéiques (Maaloe et Hanawalt 1961). Chez ces mutants tout se passe comme si une protéine nécessaire à la mise en route de la réplication du chromosome bactérien était thermosensible (Hirota, Ryter et Jacob 1968). Divers résultats permettent de penser que le chromosome bactérien possède le réplicateur, second élément supposé dans le modèle du réplicon. En effet Nagata et Meselson (1968) ont montré que l'origine de la réplication reste située au même endroit sur le chromosome au cours de plusieurs générations; cette origine a été localisée par plusieurs méthodes dans une même région du chromosome d' E.coli (Caro et Berg 1968, Abe et Tomizawa 1967, Wolf, Pato, Ward et Glaser 1968, Masters 1970, Worcel 1970).

Les vérifications expérimentales des prédictions du modèle proposé par Jacob, Brenner et Cuzin (1963) n'ont pas été tentées seulement dans le cas du chromosome bactérien. Pluiseurs épisomes bactériens ont été étudiés, en particulier le facteur sexuel F et le bactériophage λ d' E.coli. Le facteur F forme une unité de réplication indépendante du chromosome (Jacob et Wollman 1961). Cuzin (1965) a isolé des mutants thermosensibles du facteur F qui ne se répliquent plus à haute température. Il semble que chez ces mutants une protéine déterminée par le facteur F et servant à mettre en route la réplication de l'épisome serait devenue thermosensible (Cuzin 1965). Chez le bactériophage λ, Brooks (1965) a montré que deux protéines, O et P, déterminées par l'épisome sont nécessaires à sa réplication.

En 1968, nous avons essayé de mettre en évidence par des méthodes génétiques les différents éléments d'un réplicon: l'initiateur et le réplicateur. Le bactériophage λ semblait être le système qui convenait le mieux à cette étude.

1) Dans le cas du bactériophage λ il a été possible d'obtenir des mutants de type initiateur, mutants O et P, certains thermosensibles, d'autres ambre et d'autres défectifs absolus (Campbell 1962, Brooks 1965, Eisen 1966).

2) Des mutants qui altèrent le réplicateur ne peuvent être obtenus que dans un système où ce réplicateur n'est plus indispensable. Cette situation ne se rencontre que pour les épisomes intégrés (Jacob et Wollman 1957).

3) Le bactériophage λ est un système dont l'étude génétique a été très poussée et de nombreux résultats concernent la réplication du DNA (Dove 1968).

C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier la régulation de la réplication du bactériophage λ plutôt que celle du facteur F.

Notre travail s'appuie sur un certain nombre de données génétiques. Le chromosome du bactériophage λ a une longueur qui correspond à une cinquantaine de gènes. Brooks (1965) a montré que les gènes contigus O et P sont nécessaires à la réplication du DNA viral (figure 2). Les travaux de Matsubara et Kaiser (1968), Ogawa et Tomizawa (1968) et Signer (1969) indiquent que tous les autres déterminants viraux nécessaires à la réplication sont localisés dans une petite région qui entoure les gènes O et P: la réplication reste possible si les gènes qui n'appartiennent pas à cette région sont absents ou si ces gènes sont silencieux. D'une part Matsubara et Kaiser (1968) ont obtenu un dérivé du mutant virulent λvir (Jacob et Wollman 1954) où la plupart des gènes sont enlevés par une grande délétion (figure 2). Le segment de chromosome viral qui subsiste a été nommé λdv. Ce mutant reste capable de se répliquer; il se trouve sous forme circulaire, établi dans la souche bactérienne à l'état de plasmide. Comme le prévoyaient les résultats de Brooks, les gènes O et P sont situés dans le segment λdv. D'autre part, chez une bactérie sensible, le DNA d'un bactériophage λ défectif pour N peut être répliqué (Ogawa et Tomizawa 1968, Signer 1969). Or N est un régulateur positif nécessaire à l'expression de la plupart des gènes du bactériophage λ. Chez les mutants λ N seules deux petites régions du chromosome viral peuvent être transcrites: l'une, lue de droite à gauche, contient le gène CI (figure 2), et l'autre,

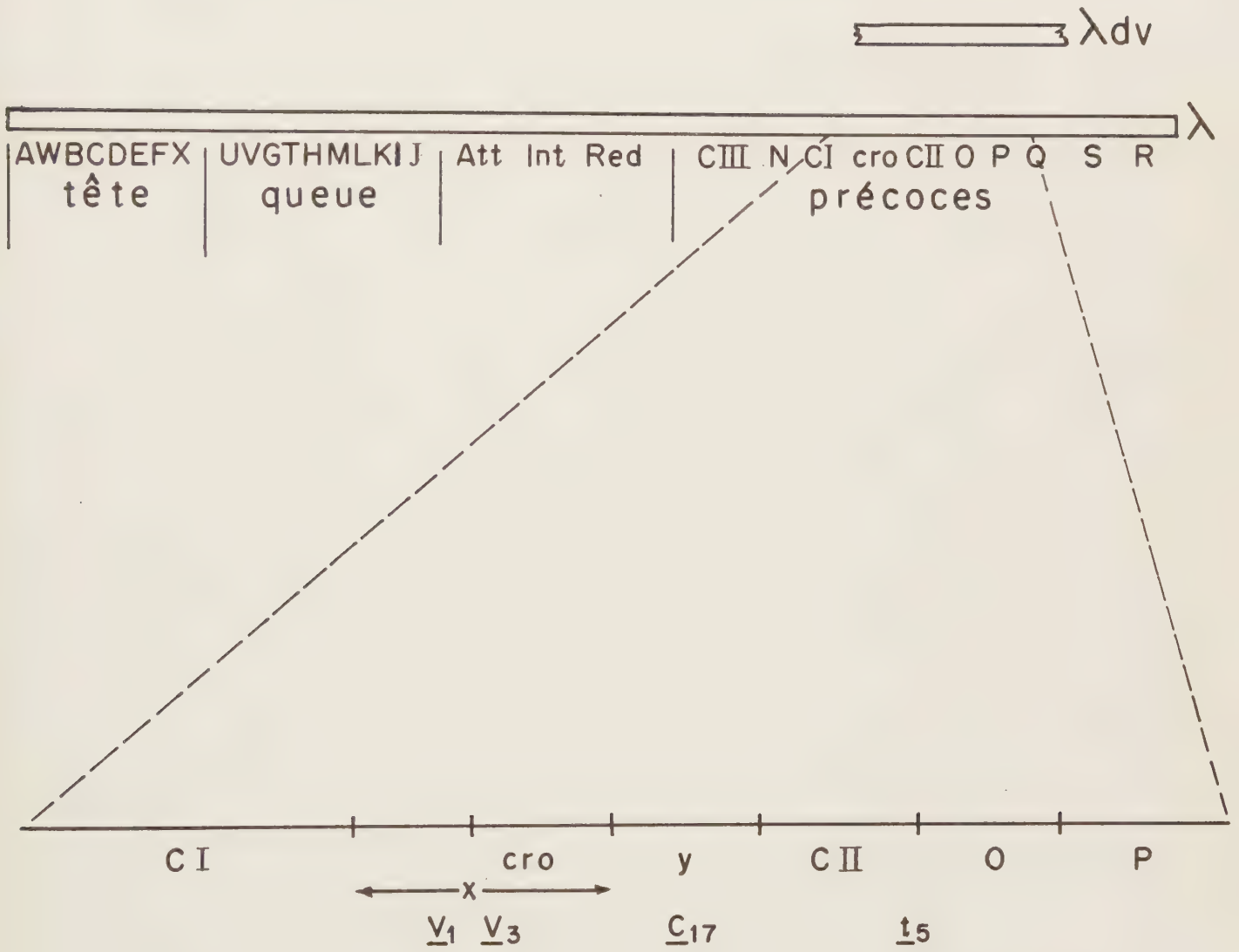


Figure 2: Carte génétique du bactériophage λ

lue de gauche à droite contient les gènes O et P (Thomas 1966, Kourilsky, Marcaud, Sheldrick, Luzzati et Gros 1968).

Les produits CI, cro, CII, O et P qui subsistent chez le plasmide λdv ou qui s'expriment chez le mutant λ N sont tous susceptibles d'être nécessaires à la réplication. Le produit du gène CI est le répresseur; il n'est pas nécessaire à la réplication puisque les mutants CI (mutants clairs) peuvent répliquer leur DNA. Eisen, Brachet, Pereira da Silva et Jacob (1970) ont montré que le gène cro détermine un produit régulateur antagoniste du répresseur. Des mutants dont le produit du gène cro est inactif continuent de se multiplier. Le produit du gène CII est une protéine qui semble faciliter l'établissement de l'immunité (Kaiser 1957). Les mutants CII (mutants clairs) ne sont pas défectifs ce qui montre que la protéine CII n'est pas nécessaire à la réplication. O et P sont donc les seuls produits viraux connus nécessaires à la réplication.

Cependant O et P ne peuvent être les seuls déterminants viraux de la réplication. On connait en effet deux cas où la réplication virale ne peut se faire même si les produits O et P sont fournis par un bactériophage auxiliaire: si le bactériophage λ est réprimé (Thomas et Bertani 1964) ou s'il porte une mutation polaire du segment x (Brachet et Green 1967). A l'état réprimé le bactériophage λ ne peut répliquer son DNA même si un second bactériophage dont l'immunité est différente apporte l'ensemble des produits diffusibles nécessaires à la réplication (Thomas et Bertani 1964). Le répresseur interdit donc la réplication par un effet indépendant de la répression des fonctions réplicatives O et P. Le répresseur pourrait interdire

la réplication virale par une action directe, en cis, lorsqu'il se fixe sur le DNA. L'inhibition de la réplication par le répresseur est effectivement levée chez un bactériophage qui porte les mutations v1 et v3 (Pereira da Silva et Jacob 1968, Dove 1968). Ces mutations rendent l'expression de O et P insensible au répresseur. Elles sont du même type que les mutations "opérateur constitutif" O^c, de l'opéron lactose d' E.coli (Jacob, Perrin, Sanchez et Monod 1960) et diminuent l'affinité du répresseur pour le DNA (Ptashne et Hopkins 1968). Cependant ce n'est pas au site de fixation du répresseur que se fait l'inhibition puisque cette inhibition est levée chez les bactériophages porteurs de la mutation c17 ou d'une mutation ric. Ces mutations, situées dans le gène CII ou à proximité, hors de la région d'immunité (Pereira da Silva et Jacob 1968, Dove 1968, Dove, Inokuchi et Stevens 1971) semblent agir comme de nouveaux promoteurs permettant la transcription en présence du répresseur. La transcription hors de la région d'immunité est donc suffisante pour lever l'inhibition due au répresseur. De plus Brachet et Green (1967) ont montré que les bactériophages porteurs d'une mutation polaire dans le segment x (figure 2) (Eisen, Fuerst, Siminovitch, Thomas, Lambert, Pereira da Silva et Jacob 1966) restent incapables de répliquer leur DNA même en présence d'un bactériophage auxiliaire. Ces mutations, comme le répresseur, interdisent la transcription et la réplication. La transcription à droite du gène CI parait donc nécessaire à la réplication virale (Dove 1968).

Plusieurs modèles peuvent expliquer ces résultats: par exemple, l'existence dans la région x O P, d'un gène essentiel à la réplication, le réplicateur du bactériopha-

ge λ. Cette hypothèse prend un intérêt particulier compte tenu des travaux de Eisen, Fuerst, Siminovitch, Thomas, Lambert, Pereira da Silva et Jacob (1966) et de Brachet et Green (1967) sur la mutation t5 qui bloque en cis la réplication du DNA viral sans en interdire la transcription. Ces auteurs considéraient qu'il pouvait s'agir d'une délétion couvrant en partie le gène O qui altérerait le gène réplicateur tout en altérant le gène O.

Dans ce travail nous avons supposé que le réplicateur était distinct, en partie du moins, des autres gènes du bactériophage λ et nous avons essayé d'obtenir des mutations qui n'altèrent que ce gène régulateur.

II - MATERIEL ET METHODES

II,1 Souches bactériennes.
II,2 Souches de bactériophages.
II,3 Milieux.
II,4 Méthodes et techniques.
II,4,1 Description de la sélection.
II,4,2 Lysogénisation par un bactériophage défectif.
II,4,3 Analyse fonctionnelle.
II,4,3,1 Mesure de l'expression des fonctions O et P.
II,4,3,2 Mesure de l'immunité; test de récupération de l'immunité.
II,4,3,3 Mesure de l'expression de la fonction R.
II,4,4 RNA messagers.
II,4,5 Isolement de dérivées su d'une souche lysogène lac am.
II,4,6 Guérison de bactéries lysogènes par surinfection par le bactériophage λ imm21 b2.

II,1 Souches bactériennes.

Les souches bactériennes suivantes ont été employées:

3000x64	Hfr Thi Lacsusx64	(Jacob et Monod 1961)
C600	Thi Thr Leu Lacy1 TonA SupE	(Appleyard 1954)
152	Thi Gal RecA Str	(Meselson)
594	Thi Str	

W3350 Thi Gal (Campbell 1961)
M72 Thi Lacsus Trpsus Str (Becwith)
QD5003 Thi SupF (Thomas et al. 1967)
M5220 Thi Lacsus Trpsus Str Lysogène (H. Green)
ΔF3, ΔM25 Thi Lacsus Trpsus Str Bio ChlA Lysogène (Castellazi, Brachet et Eisen 1972)
ΔX3, ΔX6, ΔX8 Thi Lac Pro RsGly Str Gal ChlB Lysogène (Castellazi, Brachet et Eisen 1972)

II,2 Souches de bactériophages.

Les bactériophages suivants ont été employés:

λ
λ CI57
λ CI857 Osus29
λ CI857 Psus80
λ Nsus7 Nsus53 CI857
λ Nsus7 Nsus53 CI857 Psus3
λ Nsus7 Psus3
λ CI857 Fsus204
λ b2 CI
λ y2001
λ c17
λ c42
λ CII68
λ CII2002
λ imm434

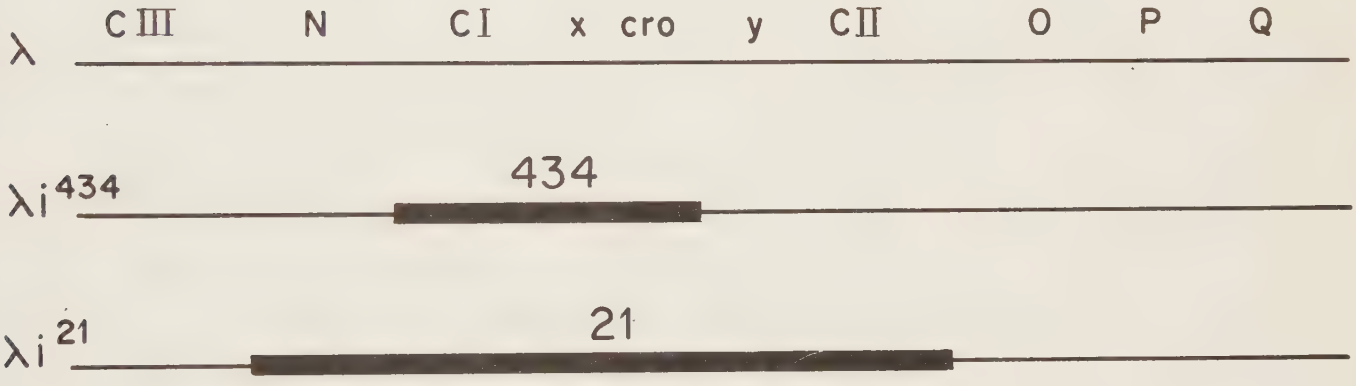
λ imm434 CII2002 Q203
λ imm434 CII2038 Osus8
λ imm434 CII3056 Psus3
λ imm434 CII3057 Psus3
λ imm434 CII2002 Rsus216
λ imm434 CII2002
λ imm434 Osus29 Psus3
λ imm434 CI Osus29 Psus80
λ imm434 Nsus7 Nsus53
λ imm21
λ imm21 CI Osus29
λ imm21 CI Psus3
λ imm21 b2
T4 rII1589

Les bactériophages λ imm434 et λ imm21 ont été obtenus par Kaiser et Jacob (1957), les mutations CI57, c42, CII68 par Kaiser (1957'). La mutation b2 a été obtenue par Kellenberger, Zichichi et Weigle (1960), les mutations CII2038, CII3056, CII3057, CII2002, y2001 par Brachet et Thomas (1969), les mutations ambre O8, O29, P3, P80, N7, N53 par Campbell (1961), la mutation c17 par Pereira da Silva et Jacob (1968), les mutations ambre F204, Q203 R216 par Thomas et al. (1967) et la mutation CI857 rendant le produit CI thermosensible, par Sussmann et Jacob (1962).

Les bactériophages λ imm434 et λ imm21.

Les bactériophages hybrides λ imm434 et λ imm21 ont été obtenus par recombinaison entre les bactériophages λ et les deux bactériophages 434 et 21 (Kaiser et Jacob 1957). Ces bactériophages hybrides ne diffèrent de λ que par une région qui leur est spécifique, comprenant

notamment le gène de l'immunité, c'est à dire du répresseur viral. Les recombinaisons avec le bactériophage λ sont impossibles seulement dans cette région qui est dite pour cette raison région de non homologie et notée imm434 ou imm21.



Le bactériophage λ imm21 ne possède pas le gène régulateur N de λ et ne produit pas de fonction interchangeable avec le produit régulateur N pour induire en trans l'expression du gène tardif Q (Couturier et Dambly 1970). Par contre le bactériophage λ imm434 possède le gène N de λ et en a besoin pour exprimer ses fonctions tardives.

II,3 Milieux.

Les milieux suivants ont été employés:

Milieu minéral (milieu 63)

Ce milieu est composé de manière suivante:

Phosphate monopotassique	13,6 g
Sulfate d'Ammonium	2,0 g
Sulfate de Magnésium	0,2 g
Sulfate de Fer	0,005 g

pH amené à 7,2 avec de la lessive de potasse. Volume amené à 1 litre avec de l'eau distillée. L'aliment carboné (glucose) est ajouté à la concentration de 6g/litre.

Milieu complet ou Milieu L

Bactotryptone	10 g
"Yeast extract"	5 g
Chlorure de sodium	5 g

pH ajusté à 7 avec de la soude. Volume amené à 1 litre avec de l'eau distillée.

Milieu E.M.B.

Bactotryptone	10 g
"Yeast extract"	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate disodique	2 g

pH ajusté à 7,4 avec de la soude. Volume amené à 1 litre avec de l'eau distillée.

Les milieux de culture sont stérilisés à l'autoclave pendant 20 min à 120°C. Les cultures sont effectuées soit en milieu liquide avec agitation, soit en milieu solide obtenu par addition de gélose, à une concentration finale de 15%, aux milieux décrits ci-dessus.

II,4 Méthodes et techniques.

Les techniques habituelles ont été utilisées pour la croissance des bactéries, la préparation des souches lysogènes, l'adsorption des bactériophages et la préparation des recombinants. Nous détaillerons seulement quelques techniques particulièrement importantes pour ce travail.

II,4,1 Description de la sélection.

Des clones de la souche 3000x64(λ N7 N53 CI857) sont mis en culture dans 5 ml de milieu L. Les cultures sont agitées à 30°C jusqu'à une concentration de 10^7 particules par ml. Elles sont ensuite agitées à 42°C pendant 24h. Des dilutions sont étalées sur des boites de milieu L gélosé pour obtenir après 24h d'incubation à 42°C environ 200 colonies par boite. Ces colonies sont répliquées sur des boites de milieu EMB0 nappées du bactériophage λ imm434 CI O29 P80 incubées ensuite 12h à 42°C. Les colonies de bactéries où ce bactériophage peut se multiplier donnent une région de lyse (accompagnée d'une coloration violette foncée). Les colonies dont les répliques sont lysées par le bactériophage λ imm434 CI O29 P80 sont conservées.

II,4,2 Lysogénisation par un bactériophage défectif.

La souche à lysogéniser par un bactériophage défectif est cultivée en milieu complet jusqu'à une concentration de 2.10^8 bactéries / ml. On infecte les bactéries remises

en suspension dans une solution M/100 de $MgSO_4$ en ajoutant une suspension de bactériophages défectifs à raison de 5 particules virales par bactérie ou un lysat obtenu par surinfection d'une souche lysogène pour le bactériophage défectif. Les bactéries infectées sont maintenues à 33°C pendant 15 min pour permettre l'adsorption des bactériophages, puis étalées sur milieu complet EMBO nappé de 10^9 bactériophages clairs par boite. Après incubation les colonies bien rondes et non muqueuses sont isolées deux fois et l'on en conserve quelques unes dont les bactéries ont acquis l'immunité. Pour vérifier qu'un bactériophage clair n'est pas en colysogènie les bactéries immunes sont induites. Une bactérie immune et ne libérant pas de bactériophages clairs après induction est conservée.

II,4,3 Analyse fonctionnelle.

Les mesures de l'expression des fonctions O, P, cro et R seront détaillées ci après.

II,4,3,1 Mesure de l'expression des fonctions O et P.

L'expression des fonctions O et P d'un bactériophage se mesure par complémentation: une bactérie est infectée simultanément par un bactériophage portant une mutation ambre O (ou P) et par le bactériophage étudié, afin de savoir si le second aidera le premier à se multiplier.

La souche bactérienne dans laquelle on veut effectuer la mesure est cultivée en milieu complet jusqu'à une

concentration de 2.10^8 bactéries / ml. Les bactéries sont en suspension dans une solution M/100 de MgSO4 et les deux bactériophages sont ajoutés à raison de 3 particules par bactérie, pour que l'infection soit très souvent mixte. Les bactéries infectées, maintenues à 33°C pendant 15 min, sont centrifugées et mises en suspension en milieu 63 pour diminuer le nombre de bactériophages libres non adsorbés. Ce mélange est dilué 100 fois en milieu complet puis incubé 90 min à 37°C. Du chloroforme est ajouté et le lysat obtenu est titré.

Le nombre de bactériophages O (ou P) produits mesure la complémentation de la fonction O (ou P) par le second bactériophage.

Dans le cas de la mesure de l'expression de la fonction O (ou P) par un prophage, une bactérie lysogène pour le prophage est infectée par le bactériophage O (ou P), et induite. Le rendement en bactériophages O (ou P) mesure la complémentation.

L'infection mixte peut aussi être effectuée sur milieu solide pour permettre un test rapide.

La souche bactérienne dans laquelle on veut effectuer le test est cultivée en milieu complet jusqu'à une concentration de 10^9 bactéries / ml et 0,2 ml de la culture sont étalés en surcouche de gélose molle sur une boite de milieu solide. Une goutte d'une suspension de l'un des bactériophages (10^8 particules / ml) et une goutte d'une suspension également concentrée de l'autre bactériophage, sont disposées côte à côte sur la boite, de telle sorte qu'en s'étalant sur la gélose les deux suspensions se mêlent et qu'en cet endroit les bactéries soient infectées par les deux bactériophages à la fois. Séparément une goutte de chaque suspension est étalée pour servir de témoin.

Après incubation, si deux bactériophages défectifs se complémentent, ils donnent une région de lyse là où les bactéries étaient infectées par les deux bactériophages à la fois.

Si les deux bactériophages sont mutés dans le même gène mais en des sites différents on ne verra que quelques plages de lyse dues à de rares recombinants.

II,4,3,2 Mesure de l'immunité; test de récupération de l'immunité.

Lorsqu'une souche lysogène pour un prophage thermoinductible N porteur d'une mutation O (ou P) est cultivée à haute température (42°C) les bactéries continuent de se multiplier et se trouvent alors sans immunité. Dans le cas de la mutation CI857 l'inactivation du répresseur est réversible. Cependant lorsque les cultures des souches précédentes sont ramenées à la température permissible de 33°C on observe que l'immunité n'est pas recouvrée même après quelques générations. Toutefois on peut isoler des souches porteuses d'une mutation supplémentaire (cro) (Eisen, Brachet, Pereira da Silva et Jacob 1970) chez lesquels l'immunité réapparait après quelques générations. Ceci s'interprète bien si l'on admet que l'expression du gène CI est bloquée par un répresseur précisement inactivé sous l'effet d'une mutation cro. Les mutations cro permettent donc d'identifier un gène répresseur du gène CI.

Notons qu'un prophage N CI857 x possède la même propriété qu'un prophage N CI857 cro O pour ce qui est de la récupération de l'immunité. Les mutations x en effet (voir Introduction) exercent un effet polaire

sur le gène cro.

Dans ces conditions le test de récupération d'immunité est effectué de la manière suivante. Une souche lysogène pour le prophage est cultivée à 42°C en milieu complet jusqu'à 10^9 bactéries / ml et 0,2 ml de la culture sont étalés sur deux boites de milieu complet. Une goutte d'une suspension contenant des bactériophages λ CI à une concentration de 10^8 particules / ml est déposée sur chaque boite. Une boite est incubée à 33°C et l'autre à 42°C. Si l'on peut voir des plages sur la boite à 33°C on considère que la souche ne récupère pas son immunité. Sinon, à condition qu'il y ait des plages sur la boite incubée à 42°C pour montrer que la souche est sensible au bactériophage et que le répresseur est bien thermosensible, on considère que la souche récupère l'immunité.

II,4,3,3 Mesure de l'expression de la fonction R par une bactérie lysogène. Activité lysozyme.

Les souches sont cultivées à 33°C, jusqu'à environ 2.10^8 bactéries / ml puis sont portées à 40°C pour induire les prophages. Après une heure d'aération à 40°C, des échantillons sont prélevés et traités aux ultrasons (Mullard 20 Kc/sec) pendant 1 min à 0°C.

Le substrat employé pour la mesure de lysozyme est la souche C600 traitée à l'EDTA puis resuspendue en tampon phosphate 0,011 M, pH 6,8 (Jacob et Fuerst 1958, Campbell et Del Campillo Campbell 1963).

On suit la décroissance de la densité optique à 600 mμ, mesurée avec le spectrophotomètre Cary 14, pour 1 ml de substrat traité par 0,1 ml de sonicat à 25°C.

L'unité d'activité correspond à une chute de densité optique de 0,001 / min (Dambly, Couturier et Thomas 1968).

II,4,4 RNA messagers.

Les méthodes employées ci-dessous sont décrites de façon détaillée par Kourilsky, Marcaud, Sheldrick, Luzzati et Gros (1968).

1) Purification des RNA radioactifs: les bactéries sont cultivées à 30°C en milieu 63 additionné de 0,25 % de casamino-acides préalablement traités au charbon actif, jusqu'à la concentration de 2.10^8 particules / ml. La culture est portée à 42°C pour induire les prophages. 3 min après cette transition thermique on ajoute de l'uracile tritié (3H-5 uracile C.E.A. à 20 mC/µmole donnant une concentration finale de 10µC/ml). L'incorporation est arrêtée après 1 min par addition de glace et de NaN_3 (concentration finale M/100). Les bactéries sont lysées au moyen de trois congélations successives en présence de lysozyme et de DNAse. Le RNA est isolé par une extraction au phénol puis précipité à l'éthanol. La concentration de l'échantillon est déterminée par analyse spectrophotométrique.

2) Préparation des filtres contenant chaque chaine du DNA de λ: 250 γ de bactériophages purifiés concentrés sont traités à 100°C pendant 4 min en présence de poly IG en tampon sarkosyl EDTA pour obtenir la libération et la séparation des chaines. La préparation est centrifugée dans un gradient de CsCl à l'équilibre. Les deux fibres

sédimentent dans des régions différentes du gradient et peuvent être récoltées séparément. Juste avant usage les fractions, diluées en 2 SSC, sont chauffées 4 h à 66°C pour renaturer les quelques doubles hélices qui pourraient se reformer (et qui ne se fixeront pas au filtre) et un γ de DNA est fixé sur la membrane de nitrate de cellulose par filtration. Ces filtres sont ensuite séchés sous vide.

3) Hybridation avec les chaines r et l du DNA de λ: des filtres contenant 1 γ de chaque fibre de DNA de λ sont mis en présence de 0,05 ml de la préparation de RNA en tampon 5 SSC. L'échantillon est incubé 48h à 66°C. Les filtres sont lavés plusieurs fois en tampon 2 SSC puis traités à la RNAse, relavés, séchés et leur radioactivité mesurée. La radioactivité contenue au départ dans les 0,05 ml de la préparation de RNA est mesurée indépendamment. On peut alors calculer la fraction de RNA hybridable avec chaque chaine du DNA du bactériophage λ.

II,4,5 Isolement de dérivés su d'une souche lysogène lac am.

Lorsqu'une souche bactérienne porte une mutation ambre lac il est facile d'isoler une souche mutante su. Les bactéries sont étalées sur un milieu de croissance contenant du lactose comme seule source de carbone. Parmi les réverses lac^+ obtenues certaines ont simplement acquis une mutation su. Pour repérer ces souches su on peut chercher celles chez qui le bactériophage λ imm434 N7 N53, par exemple, qui porte deux mutations ambre,

peut se multiplier. Dans le cas où la souche lac de départ est lysogène pour un prophage portant des mutations ambre, le prophage risque de se multiplier dans la souche dérivée su: on doit alors utiliser un clone immun et sélectionner la souche dérivée su dans des conditions où les bactéries restent immunes.

II,4,6 Guérison de bactéries lysogènes par surinfection par le bactériophage λ imm21 b2.

Les bactéries lysogènes sont étalées (à 33°C si le prophage est thermoinductible) en présence du bactériophage λ imm21 b2. A partir de là, des clones sont réisolés plusieurs fois. Dans la plupart des cas ces clones proviennent de bactéries infectées par un bactériophage λ imm21 b2 qui ne s'est pas développé mais qui a exprimé son immunité. Cette infection abortive se termine par la dilution du bactériophage surinfectant après quelques générations mais elle a été suffisante pour autoriser dans un certain nombre de cas l'expression des fonctions int et xis nécessaires à l'excision du prophage. De fait environ la moitié des clones réisolés sont devenus sensibles au bactériophage λ ce qui montre qu'ils sont constitués de bactéries guéries ayant perdu leur prophage.

III - ETUDE DE MUTATIONS ALTERANT LA REPLICATION DU BACTERIOPHAGE λ PAR UN EFFET POLAIRE SUR L'EXPRESSION DE L'OPERON x O P

Chapitre 1 : Sélection de mutants du bactériophage λ N7 N53 CI857 qui n'ont pas d'effet létal sur la bactérie hôte et qui complémentent le bactériophage λ imm434 O P (mutants de la classe A).

§ 1. Principe de la sélection.

A l'inverse des mutants de réplication déjà connus chez le bactériophage λ (O, P et x), des mutants du seul gène réplicateur pourraient continuer d'exprimer les fonctions O et P. Pour rechercher de tels mutants nous avons effectué une sélection en deux étapes: la première étape consiste à sélectionner des mutants du bactériophage λ incapables de répliquer leur DNA; la seconde étape est destinée à trouver parmi ces mutants ceux qui restent capables d'exprimer les fonctions O et P.

Pour isoler des bactériophages λ incapables de répliquer leur DNA nous avons utilisé la méthode mise au point par Eisen, Pereira da Silva et Jacob (1968). Nous avons utilisé le bactériophage λ porteur des mutations N7 N53 CI857. Les mutations N7 et N53 du gène N, toutes deux de type ambre, rendent négligeable l'expression de la fonction N. La mutation CI857 rend le répresseur thermolabile et permet d'obtenir l'induction du bactériophage λ N7 N53 CI857 par élévation de la température. Eisen, Pereira da Silva et Jacob (1968) ont constaté qu'une bactérie lysogène pour ce prophage N7 N53 CI857 est

tuée à haute température. Dans ces conditions, le prophage est induit, les fonctions réplicatives O et P s'expriment mais l'excision, qui nécessite l'expression de N, ne se produit pas. De plus les seules bactéries lysogènes qui survivent à l'induction thermique (environ 1/100 000) et qui se multiplient à haute température portent un prophage qui ne peut plus répliquer son DNA car il possède une mutation supplémentaire O ou P, ou une mutation polaire dans le segment x (Eisen, Pereira da Silva et Jacob 1968). Ces résultats permettent de supposer que la réplication du prophage est la cause de l'effet létal. Cette méthode pouvait a priori permettre d'isoler en plus de ces mutants des mutants du gène réplicateur. A partir d'une population de bactéries lysogènes pour le bactériophage λ N7 N53 CI857 nous avons cherché parmi les survivantes à l'induction celles chez qui un bactériophage λ imm434 O P peut se multiplier. Elles doivent posséder un prophage capable de fournir les fonctions O et P mais qui ne peut assurer sa propre réplication. On doit donc s'attendre à trouver des mutants d'un type nouveau (ni O, ni P, ni x) et parmi eux des mutants du réplicateur.

§ 2. Propriétés de la souche E.coli (λ N7 N53 CI857) utilisée.

La première étape de notre sélection repose sur les propriétés d'une souche d' E.coli K12, 3000x64, que nous avons rendue lysogène pour le bactériophage λ N7 N53 CI857. Cette souche ne porte pas de suppresseur de telle sorte que la fonction N ne peut pas être exprimée, mais elle porte la mutation lacZ x64 de type ambre qui

permet l'obtention aisée de mutants bactériens su. L'induction thermique du bactériophage λ N7 N53 CI857 dans la souche 3000x64 entraine un effet létal (figure 3) similaire à celui qui avait déjà été observé dans d'autres souches (Eisen, Pereira da Silva et Jacob 1968). Nous avons vérifié, en utilisant une infection mixte par les bactériophages λ CI857 O29 et λ CI857 P80 (tableau 1) que l'on peut effectuer des mesures de complémentation dans cette souche bactérienne, mesures nécessaires à la seconde étape de la sélection.

§ 3. Obtention des mutants.

Pour obtenir des mutants du bactériophage λ qui ne peuvent pas se répliquer mais qui peuvent exprimer les fonctions O et P la sélection décrite (Matériel et Méthodes II,4,1) est appliquée à la souche lysogène 3000x64(λ N7 N53 CI857). Au cours de cette sélection le prophage est induit par passage à 42°C et les bactéries qui survivent sont conservées. Pour que l'induction thermique soit totale elle est faite en milieu liquide. Pour que les bactéries lysogènes mutantes obtenues non seulement survivent mais se multiplient à haute température les cultures sont portées à 42°C lorsque la concentration bactérienne est seulement 10^7 particules par ml, c'est à dire dans un milieu pas encore épuisé où les bactéries survivantes continueront donc de se multiplier. Les volumes employés étant 5 ml, le nombre de bactéries lysogènes soumises au choc thermique, 5.10^7, est assez grand pour que certaines de ces bactéries contiennent des prophages mutants beaucoup plus rares que les mutants

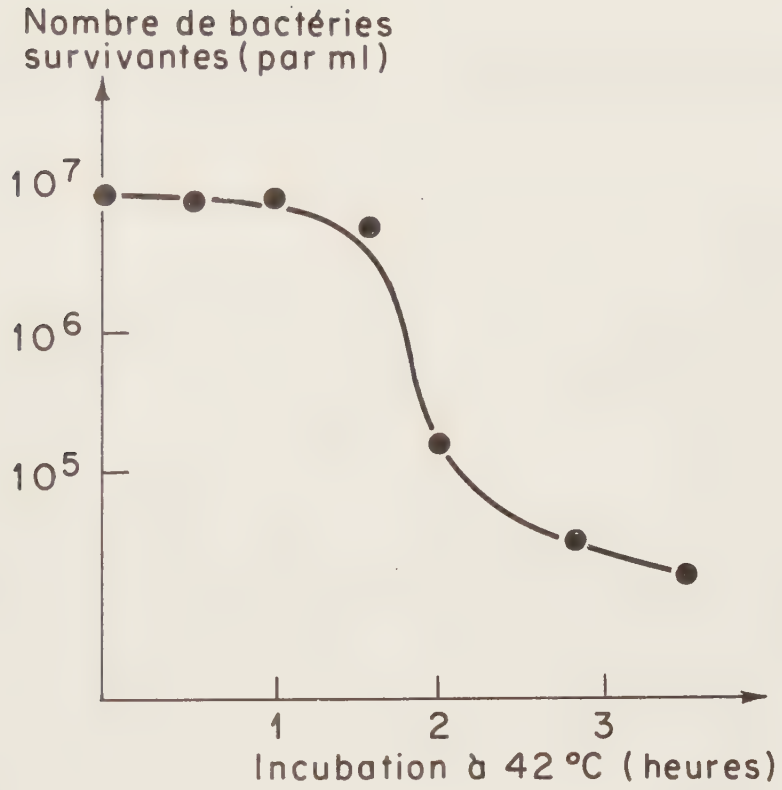


Figure 3: Effet de l'induction thermique sur la souche 3000x64 (λ N7 N53 CI857).

La bactérie lysogène est cultivée à 30°C en milieu complet liquide jusqu'à une concentration de 10^7 particules / ml puis portée à 42°C. A des temps variés, des échantillons sont prélevés, puis étalés après dilution sur milieu complet solide et incubés à 30°C.

Tableau 1. Complémentation entre les bactériophages λ CI857 O29 et λ CI857 P80.

Infection de 3000x64 par	Production de bactériophages dans le lysat					
	CI857 O29			CI857 P80		
	nombre de bactéries / ml	nombre de bactériophages produits / ml	rendement par bactérie	nombre de bactéries / ml	nombre de bactériophages produits /ml	rendement par bactérie
CI857 O29	8.10^7	10^7	0,1	...	...	...
CI857 P80	...	...	...	8.10^7	10^7	0,1
CI857 O29 et CI857 P80	8.10^7	$1,5\ 10^9$	20	$8\ 10^7$	$0,8\ 10^9$	10

Les bactériophages produits sont étalés sur la souche indicatrice su C600. La taille des plages formées permet de distinguer les bactériophages CI857 O29 et CI857 P80 qui donnent respectivement des grandes et des petites plages.

O, P et x. Ceux-ci apparaissent à une fréquence 1/10 000 à 1/100 000 (Eisen, Pereira da Silva et Jacob 1968). Enfin pour que le répresseur ne bloque pas chez les mutants une éventuelle expression des fonctions O et P, les bactéries sont maintenues à 42°C pendant la suite de la sélection.

Nous avons observé, en utilisant la souche lysogène 3000x64(λ N7 N53 CI857), qu'environ 1 bactérie parmi 50 survivantes à l'induction thermique est lysée par le bactériophage λ imm434 O29 P3 et répond ainsi au critère de sélection. La fréquence de tels mutants par rapport au nombre initial de bactéries lysogènes est donc de l'ordre de 10^{-6}. Une trentaine de mutants indépendants ont été isolés.

Les mutations additionnelles correspondantes forment une classe, non nécessairement homogène, que nous appelons classe A. Les mutations sont notées "r", pour rappeler "réplication", suivi d'un numéro ou "rA" lorsque l'on ne précise pas de quelle mutation de la classe il s'agit. Parmi ces mutations, quatre ont été particulièrement étudiées: r11, r13, r14 et r32.

§ 4. Mesure de l'expression des fonctions O, P et cro.

La sélection ne devait fournir que des mutants du bactériophage λ N7 N53 CI857 capables d'exprimer les fonctions réplicatives O et P, donc de complémenter des mutants O ou P. L'examen du tableau 2 montre que les mutants de la classe A remplissent cette dernière exigence lorsque les bactériophages O ou P portent la région imm434. Il apparait donc que les mutations rA

Tableau 2. Analyse fonctionnelle de deux mutants rA.

bactérie lysogène induite	Bacteriophage surinfectant							
	imm434 CII O8		imm434 CII P3		imm21 CI O29		imm21 CI P3	
	bactériophages produits par bactérie		bactériophages produits par bactérie		bactériophages produits par bactérie		bactériophages produits par bactérie	
	imm434	immλ	imm434	immλ	imm21	immλ	imm21	immλ
152(λ N7 N53 CI857)	54	24	54	25	25	1,5	71	1,3
152(λ N7 N53 CI857 r14)	58	4,7	64	6,6	0,06	0,01	1,2	0,01
152(λ N7 N53 CI857 r32)	47	9	55	8,3	0,06	0,01	3	0,01
152	0,05	-	0,06	-	0,04	-	0,07	-

Les bactéries sont infectées à une multiplicité de 3 à 5. Après 15 min à 33°C pour permettre l'adsorption des bactériophages, les bactéries sont centrifugées, pour éliminer les bactériophages non adsorbés, remises en suspension en MgSO4 M/100, agitées 20 min à 42°C puis 60 min à 37°C. Du chloroforme est ajouté et les bactériophages produits sont étalés sur les souches indicatrices lysogènes dérivées de C600 (souche su). L'infection par des mutants de λ et λ imm434 conduit à des résultats identiques.

ont modifié les conditions d'expression des fonctions O et P.

La mesure de l'expression de la fonction cro ne nécessite pas l'emploi d'un bactériophage surinfectant. Nous avons observé en utilisant les conditions décrites dans Matériel et Méthodes II,4,3,2 que les bactéries lysogènes pour les mutants de la classe A, ramenées à 33°C après culture à 42°C ne récupèrent pas l'immunité. Ceci suggère que les mutants expriment la fonction cro.

Nous avons vérifié que les résultats de l'analyse fonctionnelle restent les mêmes lorsque le prophage est transféré dans différentes souches bactériennes. Les mutations rA sont donc virales.

§ 5. Exigence de la fonction N pour l'expression des fonctions O et P chez les mutants.

Les prophages de la classe A ne complémentent pas les mutants O et P de λ imm21 mais complémentent les mutants O et P de λ et de λ imm434. Or un produit régulateur commun aux bactériophages λ et λ imm434, le produit du gène N, est absent chez le bactériophage λ imm21 (Couturier et Dambly 1970). Peut-être chez les mutants de la classe A l'expression des fonctions O et P est dépendante de la présence d'un gène N fonctionnel comme c'est toujours le cas pour l'expression de la fonction Q chez le bactériophage λ sauvage (Couturier et Dambly 1970). S'il en est ainsi, les mutations rA doivent être corrigées dès que le produit N est présent. Les bactériophages λ N7 N53 CI857 rA doivent notamment pouvoir se multiplier dans une souche su où les mutations N7 et N53 seront

corrigées. Effectivement, les souches lysogènes su dérivées des mutants de la classe A (voir Matériel et Méthodes II,4,5) produisent après induction des particules virales qui sont capables, comme attendu, de faire des plages de lyse sur la bactérie indicatrice su C600.

De plus des particules de type prophage ont été obtenues directement à partir d'une bactérie lysogène pour λ N7 N53 CI857 rA par infection par λ imm21 et ces particules sont capables de se multiplier sur une souche indicatrice su C600(λ imm21). Il a été vérifié que ces particules ont bien les caractéristiques des bactériophages λ N7 N53 CI857 rA.

Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse que l'expression des fonctions O et P chez les mutants rA est sous la dépendance stricte du produit N. Ceci d'une part rend compte des complémentations des bactériophages hétéroimmuns O et P par les mutants et du caractère suppressible des mutations et d'autre part explique comment les bactéries lysogènes de la classe A survivent à l'induction thermique: n'exprimant pas la fonction N elles n'expriment donc pas non plus les fonctions réplicatives O et P. Notons que n'est pas exclus une interprétation selon laquelle les mutations rA seraient directement supprimées par le gène su de la souche C600. On verra plus loin un argument qui contribue à rendre cette hypothèse improbable.

Si la suppression de l'effet de la mutation rA est bien due à l'expression du gène N on est conduit à admettre l'existence d'une interaction entre le produit N et l'expression des fonctions réplicatives O et P. Nous avons donc recherché si une interaction de ce type peut être mise en évidence chez un bactériophage λ qui ne porte pas de mutation rA.

Chapitre 2 : Etude de l'effet du produit N sur l'expression de l'opéron x O P chez le bactériophage λ.

§ 1. Hypothèse de stimulation par le produit N de l'expression de l'opéron x O P. Mesure par complémentation de la fonction O, soit en présence, soit en absence du produit du gène N.

Lorsqu'il porte une mutation N le bactériophage λ reste capable de répliquer son DNA (Ogawa et Tomizawa 1968). Ceci montre que la fonction N n'est pas nécessaire à l'expression des fonctions réplicatives, c'est à dire à l'expression de l'opéron x O P. Cependant le bactériophage mutant λ N réplique seulement faiblement son DNA ce qui peut s'expliquer par l'hypothèse que l'expression de l'opéron x O P est limitée en l'absence du produit du gène N (Ogawa et Tomizawa 1968, Thomas et Bertani 1964). Kourilsky, Marcaud, Sheldrick, Luzzati et Gros (1968) ont effectivement montré que la synthèse du messager de l'opéron x O P est stimulée par le produit du gène N. Nous avons voulu savoir si une augmentation de l'expression des fonctions O et P est visible par des mesures de complémentation. S'il en est ainsi un bactériophage λ N doit mieux complémenter le bactériophage λ imm434 O qui apporte la fonction N que le bactériophage λ imm21 O qui ne l'apporte pas. Effectivement, comme on peut le voir sur le tableau 3, le bactériophage λ N7 N53 CI857 complémente mieux le bactériophage λ imm434 CII O8 que le bactériophage λ imm21 CI O29 (notons pourtant que l'interprétation de cette expérience comporte quelque ambiguité puisque les bactériophages λ imm434 O et λ imm21 O

Tableau 3. Complémentation des bactériophages λ imm21 CI 029 et λ imm434 CII 08 par le bactériophage λ N7 N53 CI857 dans la souche 594.

Infection mixte par	Production de bactériophages dans le lysat (par bactérie initiale)	
	bactériophages totaux	bactériophages O
imm21 CI O29 et λ N7 N53 CI857	5	1
imm434 CII O8 et λ N7 N53 CI857	18	4

Tableau 4. Complémentation du bactériophage λ imm21 CI 029 par les bactériophages λ CI857 P80 et λ N7 N53 CI857 dans la souche 152.

Infection mixte par	Production de bactériophages dans le lysat (par bactérie initiale)	
	bactériophages totaux	bactériophages O
imm21 CI O29 et λ CI857 P80	20	8
imm21 CI O29 et λ N7 N53 CI857	5	2

ne diffèrent pas par le seul gène N). De façon semblable un bactériophage λ imm21 O doit être mieux complémenté par un bactériophage λ N^+ que par un bactériophage λ N. Effectivement, comme on peut le voir sur le tableau 4, le bactériophage λ imm21 CI O29 est mieux complémenté par le bactériophage λ CI857 P80 que par le bactériophage λ N7 N53 CI857. Enfin lorsqu'une souche lysogène pour le bactériophage λ N7 N53 CI857 est induite pendant un temps bref un bactériophage λ imm434 O ne peut s'y multiplier que s'il est adsorbé avant l'induction (tableau 5). La présence du bactériophage λ imm434 O pendant que la souche lysogène est induite semble donc essentielle pour que la fonction O s'exprime. Puisque le bactériophage λ imm434 O apporte le produit N, ce résultat est aussi en accord avec l'hypothèse de stimulation de l'expression de la fonction O par le produit N.

§ 2. Discussion.

Les résultats précédents montrent que chez le bactériophage λ une stimulation de l'expression de la fonction O par le produit du gène N peut être mise en évidence par des mesures de complémentation: la production de bactériophages λ O est multipliée environ quatre fois en présence de la fonction N. Dans l'ignorance où l'on se trouve de la stoechiométrie des réactions mises en jeu on ne peut dire à quel accroissement de la synthèse de produit O les variations correspondent. Il reste que la différence est qualitativement significative. Par ailleurs l'examen des cartes génétiques des bactériophages λ et λ imm434 montre dans quelle région doit se trouver

Tableau 5. Complémentation de la fonction O du bactériophage λ imm434 CII O8 dans la souche 3000x64(λ N7 N53 CI857) en fonction des conditions d'induction.

Surinfection	Production du bactériophage imm434 CII O8 surinfectant (par bactérie initiale)
Avant induction	35
Après induction	2

La souche 3000x64(λ N7 N53 CI857) cultivée à 30°C, portée à 42°C pendant 20 min, puis ramenée à 30°C, est infectée par le bactériophage λ imm434 CII O8, soit juste avant soit juste après les 20 min d'induction

le site d'action du produit N: le produit N étant commun aux bactériophages λ et λ imm434, il doit agir hors de la région de non-homologie imm434 et pour stimuler O et P, il doit agir dans l'opéron x O P à gauche du gène O (figure 4). Le site d'action doit donc être dans la région x CII.

Chapitre 3 : Etude complémentaire des bactériophages mutants de la classe A.

§ 1. Caractère conditionnel des mutants. Phénotype clair.

Les bactériophages mutants de la classe A n'expriment pas les fonctions O et P sauf en présence du produit du gène N. L'objet de ce chapitre est de comprendre comment la fonction N peut supprimer l'effet des mutations rA. Puisque les prophages mutants ne sont pas défectifs absolus, l'étude des mutations a été poursuivie avec des particules virales λ N7 N53 CI857 rA que l'on peut faire multiplier dans des bactéries su. Or les bactériophages λ N7 N53 CI857 rA, contrairement au parent λ N7 N53 CI857, forment des plages claires à 33°C. Ce phénotype clair est-il dû à la mutation rA ou à une deuxième mutation?

Pour savoir si la mutation "claire" peut être dissociée de la mutation rA les croisements successifs suivants ont été réalisés. Le bactériophage λ N7 N53 CI857 rA est croisé avec le bactériophage λ imm434 et un recombinant λ imm434 clair est obtenu. Ce bactériophage est croisé en retour avec le bactériophage λ N7 N53 CI857 P3 (figure 5).

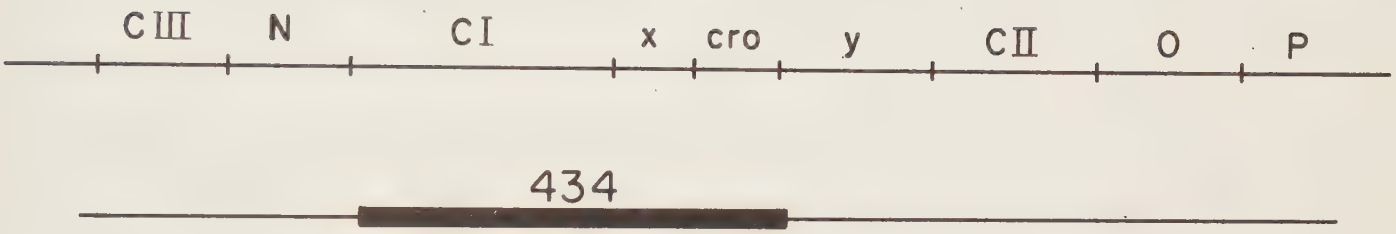


Figure 4: Carte génétique de la région des fonctions précoces des bactériophages λ et λ imm434.

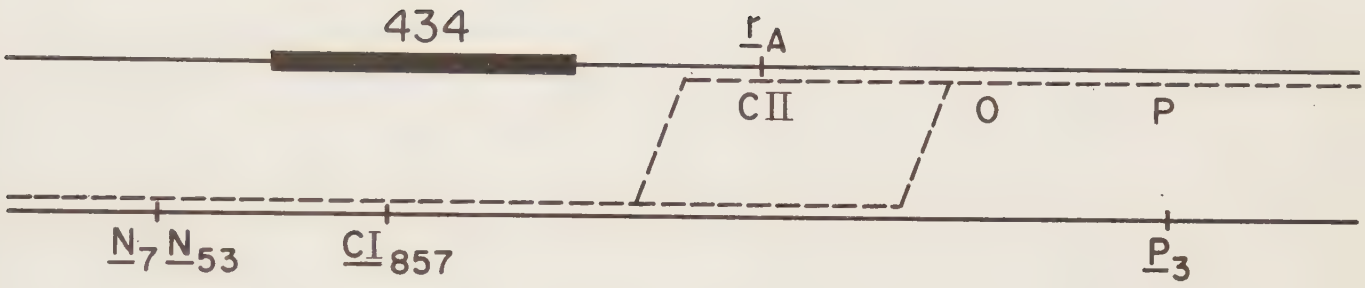


Figure 5: Diagramme des recombinants obtenus par croisement des bactériophages λ imm434 rA et λ N7 N53 CI857 P3.

Les recombinants sont étalés sur la souche QD5003 qui porte le suppresseur SupF; celui-ci corrigeant les mutations N7 N53 mais non P3 (Thomas et al. 1967). Des recombinants portant les mutations N7 N53 mais devenus P^+ sont isolés: 6 d'entre eux, formant une plage claire à 33°C ont la propriété caractéristique des mutants rA (induits comme prophages, ils n'ont pas d'effet létal sur la bactérie hôte) tandis que 20 autres, formant une plage trouble à 33°C, ont les propriétés du bactériophage λ N7 N53 CI857 (induits comme prophages, ils tuent la bactérie hôte). La mutation donnant le phénotype clair ségrège donc avec la mutation rA: le caractère clair dépend, sinon de la mutation rA elle même, du moins d'une mutation très liée.

§ 2. Localisation génétique des mutations.

Les mutations rA peuvent être localisées grâce à leur phénotype clair. Les résultats de croisements sont présentés dans le tableau 6 et conduisent à une localisation génétique indiquée sur la figure 6. Les mutations rA se trouvent dans la région y CII.

§ 3. Effet en position cis des mutations rA sur la transcription déclenchée au site cI7.

Lorsqu'elles sont portées par un bactériophage λ N7 N53 CI857 les mutations rA agissent sur l'expression des fonctions O et P. Ont-elles un même effet si la vague de transcription n'est pas celle qui commence

Tableau 6. Localisation des mutations rA.

Croisement	immλ troubles / total troubles	ordre déduit (direction CI vers O)	% troubles
imm434 r13 x			
λ CII68	8/8	r13 - CII68	0,07
λ CII2002	7/7	r13 - CII2002	0,04
λ c2001	0/5	c2001 - r13	0,02
λ c17	2/11	c17 - r13	0,03
imm434 r11 x			
λ CII2002	7/7	r11 - CII2002	
λ c42	0/6	c42 - r11	
imm434 r14 x			
λ CII68	1/7	CII68 - r14	0,01
λ CII2002	2/11	CII2002 - r14	0,11
λ c42	0/7	c42 - r14	0,12
λ c2001	0/8	c2001 - r14	0,25
λ c17	0/8	c17 - r14	0,2
imm434 r32 x			
λ CII68	14/14	r32 - CII68	0,22
λ CII2002	9/9	r32 - CII2002	0,14
λ c42	7/7	r32 - c42	0,2
λ c2001	4/4	r32 - c2001	0,03
λ CI857 N^+ r14	7/7	r32 - r14	0,1

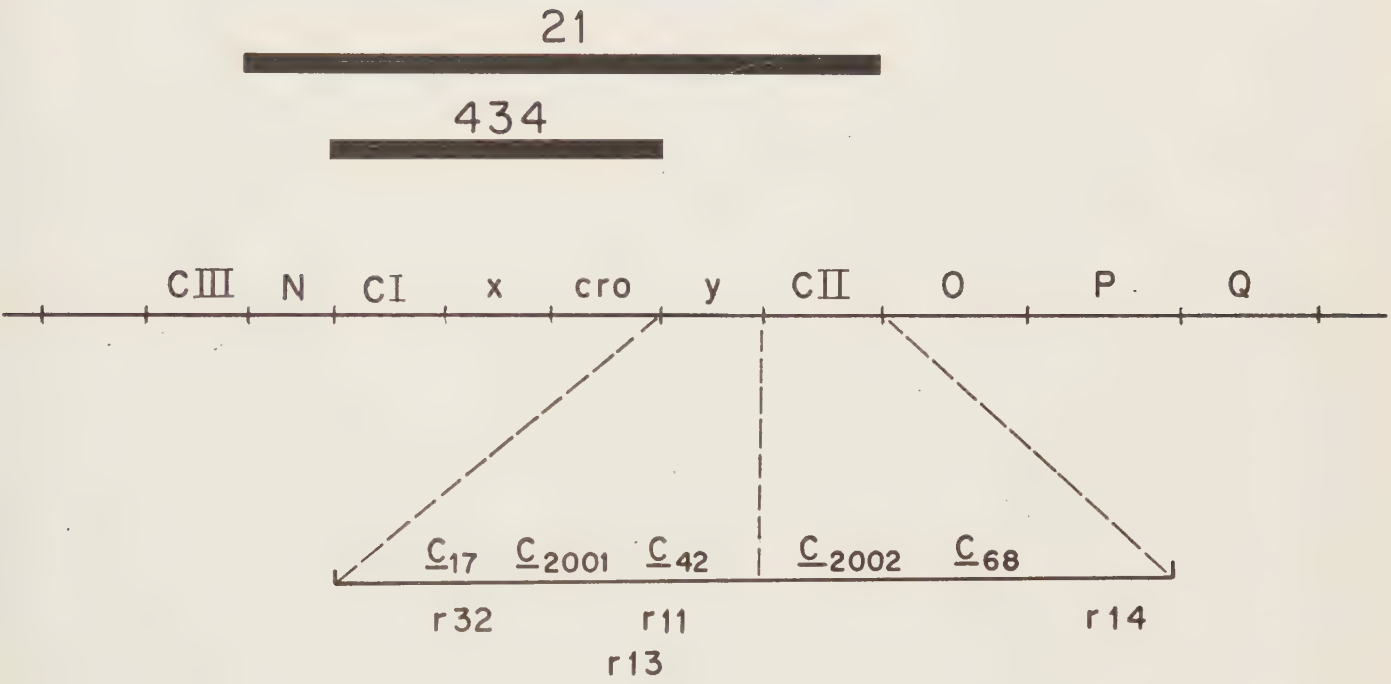


Figure 6: Carte génétique de la région c du bactériophage λ. Localisation des mutations rA par rapport aux divers marqueurs clairs y et CII.

au site normal mais celle par exemple qui est déclenchée par la mutation c17 (*) ?

Un bactériophage recombinant portant les mutations c17 et rA a été construit et l'expression des fonctions O et P y a été mesurée, par complémentation, dans un cas où la transcription des gènes O et P ne peut provenir que du promoteur c17: dans une bactérie immune où la transcription normale (celle déclenchée au début de l'opéron x O P) est réprimée. Les résultats (tableau 7) montrent que les bactériophages P sont complémentés même par un prophage portant une mutation rA mais ceci ne signifie pas que l'expression du gène P est normale. On sait en effet que, même très diminuée, cette expression suffit pour autoriser la croissance d'un bactériophage P: dans le cas d'un prophage réprimé par exemple (Thomas et Bertani 1964). Les résultats des complémentations des bactériophages O (tableau 7) montrent que la mutation rA conserve ici un effet négatif sur l'expression de la fonction O et que cet effet subsiste en présence du produit du gène N: dans le cas où la mesure est faite en présence du bactériophage λ imm434 CII O8. On peut remarquer que dans ces expériences (Tableau 7) la présence de la mutation r14 abaisse d'un facteur 7 la complémentation du bactériophage λ imm434 O. Or (tableau 2) dans le cas du prophage λ N7 N53 CI857 la présence de la mutation r14 n'avait plus d'effet observable sur la complémentation d'un bactériophage λ imm434 O. Cette "suppression" avait été attribuée à la présence du produit N apporté par le bactériophage surinfectant λ imm434 O. Il apparait

(*) La mutation c17, située dans la région y, semble agir comme un nouveau promoteur qui rend constitutive l'expression des gènes O et P (Pereira da Silva et Jacob 1968).

Tableau 7. Complémentation par les bactériophages c17 et c17 rA des fonctions O et P dans la souche 152(λ N7 P3).

Infection par	Production de bactériophages hétéroimmuns coinfectants (par bactérie initiale)			
	imm434 CII O8	imm434 CII P3	imm21 CI O29	imm21 CI P3
λ N c17	14	20	12	17
λ N c17 r14	2	48	1	29
λ r14	0,1	4	0,1	0,5

qu'ici dans un cas où la transcription est dûe au promoteur c17 la présence du produit N apporté par le bactériophage λ imm434 O n'abolit plus l'effet de la mutation rA.

Pour aborder la question du mécanisme d'action des mutations rA leur effet sur la transcription a été étudié.

§ 4. Les RNA messagers.

Pour étudier l'effet des mutations rA sur la transcription des gènes O et P, celle-ci devait être mesurée. Parmi les RNA messagers synthétisés quelques minutes après l'induction d'un prophage λ N les uns correspondent au gène N lui même, les autres à l'opéron x O P (Kourilsky, Marcaud, Sheldrick, Luzzati et Gros 1968). Les premiers peuvent s'hybrider avec la chaine l du DNA du bactériophage λ et les derniers avec la chaine r. On peut ainsi mesurer la transcription de l'opéron x O P par la quantité de RNA messagers pouvant s'hybrider avec la chaine r du DNA. Les expériences sont réalisées avec un prophage N rA et, pour comparaison, d'une part avec un prophage P et d'autre part avec un prophage N x où la transcription de l'opéron x O P est bloquée par la mutation x, de type promoteur négatif. Les RNA messagers synthétisés par ces prophages sont marqués pendant la quatrième minute après l'induction puis extraits et hybridés séparément avec les chaines l et r du DNA (Matériel et Méthodes II,4,4). Il apparait (tableau 8) que la fraction des RNA messagers hybridables avec la chaine r du DNA, beaucoup plus faible pour le mutant x que pour le mutant P, est aussi très diminuée pour les mutants rA: les mutations

Tableau 8. RNA messagers synthétisés 3 minutes après l'induction. Hybridation des RNA avec les chaines de DNA de λ.

Souche induite	% des messagers totaux pour chaque chaine		fraction relati à chaque chaine	
	r	l	r	l
W3350	0,04	0,04	50	50
W3350(λ N7 N53 CI857 P3)	0,080	0,187	30	70
W3350(λ N7 N53 CI857 x13)	0,015	0,185	7,5	92,5
W3350(λ N7 N53 CI857 r14)	0,028	0,184	13	87
W3350(λ N7 N53 CI857 r32)	0,022	0,199	10	90

Le marquage des RNA messagers, les techniques d'extraction et d'hybridation sont décrites dans Matériel et Méthodes II,4,4. Les moyennes sur deux expériences sont indiquées dans le tableau: d'une part le pourcentage de radioactivité totale hybridée avec chaque chaine et d'autre part la répartition entre les deux chaines.

rA diminuent donc la transcription dans la région x O P. Elles ont un effet comparable à celui des mutations x mais quantitativement moins marqué. De plus, alors que les mutations x ont un effet polaire sur les gènes cro, O, et P, les mutations rA permettent l'expression du gène cro et n'exercent leur effet que sur les gènes O et P: l'excès de RNA messager hybridable avec la chaine r du DNA pour les mutants rA, par rapport au mutant x, peut représenter le RNA messager du gène cro et les mutations rA ont un effet polaire sur la transcription.

§ 5. Tests de dominance.

Les mutations rA altèrerent-elles un produit diffusible nécessaire à la réplication du bactériophage λ, tel qu'un inducteur des fonctions O et P nécessaire en absence du produit N ?

Pour le savoir nous avons étudié le comportement de l'allèle rA en présence d'un allèle rA^+, mais sans autre changement. Cette étude nécessitait un système de complémentation où le produit N était absent (sinon le phénotype mutant rA disparait) aussi avons nous employé une "mesure indirecte de complémentation" dont le principe et les conditions expérimentales seront expliqués au paragraphe 2, chapitre 2, partie IV. Ainsi une expérience semblable à celle qui est présentée dans le tableau 12 a montré que les bactériophages λ N7 N53 CI857 O pgal et λ N7 N53 CI857 P pgal ne convertissaient pas en gal^+ les souches gal 152(λ N7 N53 CI857 r14) et 152(λ N7 N53 CI857 r32), tandis que le bactériophage λ N7 N53 CI857 pgal

le faisait. Le phénotype O P des prophages mutants rA subsiste donc en présence des bactériophages O pgal et P pgal qui sont rA^+ et le caractère O^+ P^+ du bactériophage N pgal subsiste (car le bactériophage continue de se répliquer) en présence des prophages rA. Les mutations rA agissent donc d'une manière cis-dominante.

§ 6. Nature des mutations.

Diverses propriétés des mutations rA s'accordent bien avec l'hypothèse qu'il s'agirait de mutations polaires:

a) d'une part elles sont cis-dominantes,

b) d'autre part elles sont localisées dans l'opéron x O P à gauche de O et de P, et ont toutes un effet négatif sur O et P.

Si l'on admet qu'il s'agit effectivement de mutations polaires, quelle est leur nature ? Elles ne semblent pas de type non sens car le phénotype clair qui leur est associé d'une part n'est pas corrigé par les suppresseurs d'ambre (SupD, SupE, SupF), d'ochre (SupB, SupC) ou de codon UGA, et d'autre part ne réverse pas après un traitement à la nitrosoguanidine (des lysats mutagénisés des bactériophages λ N7 N53 CI857 r14 et r32 contiennent moins de 1/100 000 particules formant des plages troubles à 33°C).

L'étude de certaines mutations très polaires des opérons Gal et Lac d' E.coli a montré qu'il s'agit d'insertions de DNA (Jordan, Saedler et Starlinger 1968, Shapiro 1969, Mallamy 1970). Si les mutations rA du bactériophage λ sont similaires, un bactériophage portant une telle mutation doit contenir plus de DNA et avoir une plus

grande densité (Weigle, Meselson et Paigen 1969) que le parent dont il dérive. Le profil de sédimentation en ultracentrifugeuse analytique du mélange des bactériophages λ N7 N53 CI857 r32 et λ N7 N53 CI857, et du bactériophage λ b2 CI comme repère de densité, montre qu'il en est justement ainsi (figure 7). Les densités de plusieurs mutants λ N7 N53 CI857 rA ont été mesurées et elles sont dans tous les cas supérieures à celle du parent λ N7 N53 CI857 (tableau 9). Les mutations rA conduisant à un accroissement du matériel génétique, doivent être des insertions de DNA dont la longueur peut être estimée (tableau 9) d'après Weigle, Meselson et Paigen (1969).

Starlinger a pu comparer les mutations rA avec les insertions polaires, citées plus haut, de l'opéron Gal d' E.coli. Il a mis au point une technique pour mesurer l'homologie entre un DNA donné et une des insertions polaires d'un gène Gal porté par un bactériophage λ gal. Les RNA messagers complémentaires du DNA d'un bactériophage λ gal portant une telle insertion, sont synthétisés; ils sont ensuite épuisés contre un excès de DNA du bactériophage λ gal ne portant pas l'insertion, ce qui conduit à ne conserver que les RNA messagers codés par l'insertion du gène Gal. On peut alors regarder si ces messagers s'hybrident avec un DNA donné: le niveau de cette hybridation mesure l'importance des régions du DNA donné qui sont homologues avec l'insertion. Ainsi Starlinger observe que l'insertion n 102 du gène Gal est homologue avec le DNA de λ r14 mais ne l'est ni avec celui de λ ni avec celui de λ r32 (communication personnelle). Ceci montre de façon élégante la nature très semblable de l'insertion n 102 et de la mutation r14: ces deux mutations proviendraient de l'insertion d'un matériel génétique

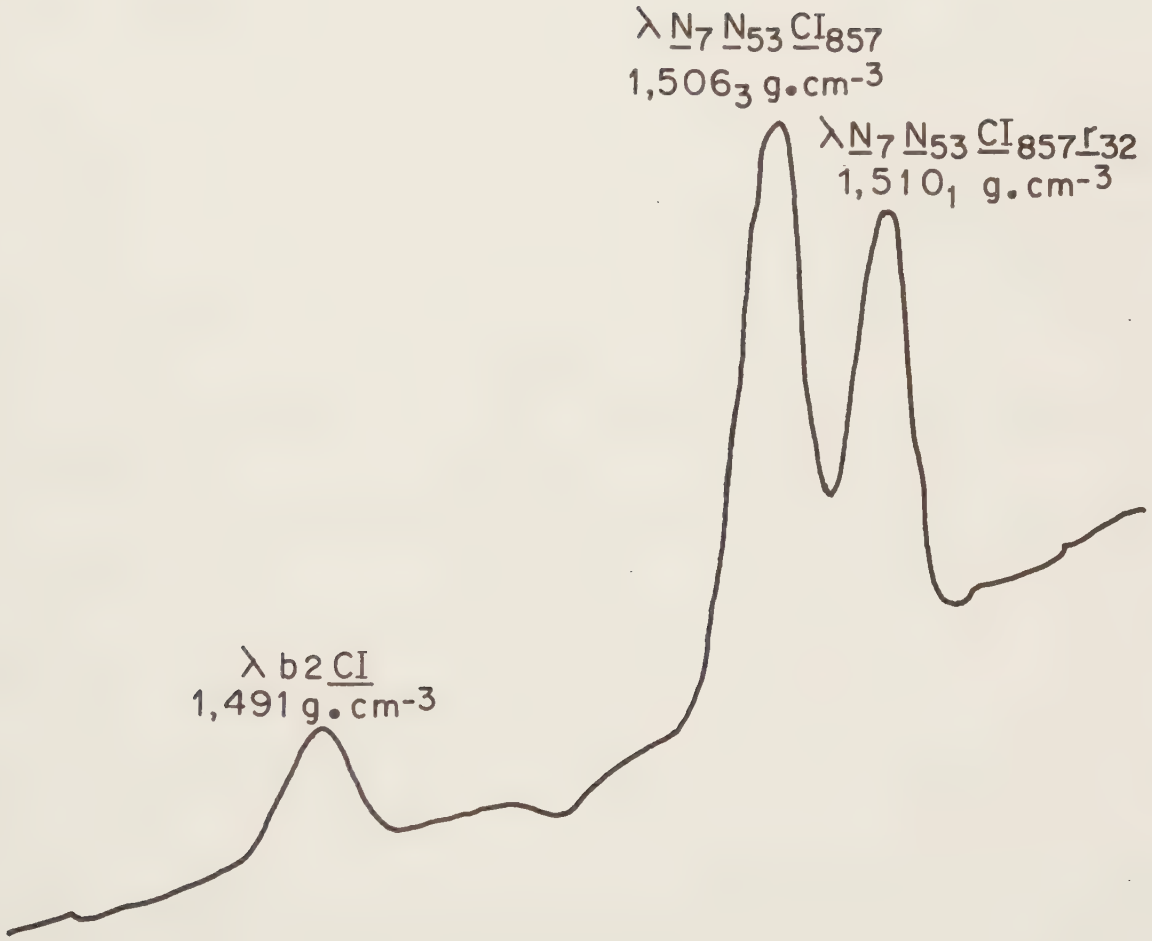


Figure 7: Profil de sédimentation en ultracentrifugeuse analytique d'un mélange des bactériophages λ b2 CI, λ N7 N53 CI857 et λ N7 N53 CI857 r32.

La figure représente l'absorption U.V. le long d'un gradient d'équilibre en CsCl, dans une ultracentrifugeuse Spinco, le rotor tournant à 25.590 t/mn.

Tableau 9. Densité de bactériophages mutants rA.

Mutant étudié	densité	Nombre de paires de bases à ajouter au bactériophage sauvage pour obtenir la même densité.
N7 N53 CI857	1,506(3)	0
N7 N53 CI857 r11	1,509(0)	1300
N7 N53 CI857 r13	1,509(3)	1450
N7 N53 CI857 r14	1,508(5)	1000
N7 N53 CI857 r32	1,510(1)	1850

-Les mesures sont faites à partir d'un gradient d'équilibre en CsCl, dans une ultracentrifugeuse analytique Spinco, le rotor tournant à 25590 t/mn.
-Les densités sont mesurées d'après les positions des pics des mutants relativement à celles du bactériophage de référence « b2 CI (figure 7).
-L'accroissement de densité est attribué à l'accroissement de la taille du matériel génétique du bactériophage et le nombre de nucléotides correspondant est calculé à partir de la formule proposée par Weigle, Meselson et Paigen (1969).

similaire. Ce matériel génétique n'apparait alors ni spécifique du gène Gal, ni spécifique du bactériophage λ. De plus r14 et n 102 appartiennent à une même classe d'homologie tandis que r32 appartient à une autre.

On peut penser que chez E.coli, existent en permanence des structures de DNA capables de s'insérer dans un génome et de provoquer un signal stop de transcription. Peut-être la structure du message génétique résulte-t-elle en partie de l'insertion de signaux stop tirés d'un jeu limité de signes de ponctuation réutilisables qui sont conservés dans la cellule. De telles structures ont peut-être été utilisées lors de l'évolution bactérienne, et des structures semblables, peut-être strictement homologues, peuvent être recherchées chez d'autres organismes.

§ 7. Discussion.

L'hypothèse suivant laquelle les mutations rA résultent de l'insertion dans l'opéron x O P d'un fragment de DNA entrainant l'apparition d'un signal stop permet d'expliquer les propriétés de ces mutations: augmentation de densité des bactériophages qui les portent, action au niveau de la transcription et effet polaire sur les gènes O et P. Dans ces conditions la "suppression" des mutations rA par un produit N fonctionnel posait un problème: on pouvait se demander si outre l'effet stimulateur sur la transcription des gènes O et P (voir chapitre 2) exercé vraisemblablement au niveau d'un promoteur situé à gauche des gènes O et P, le produit N n'était pas capable d'abolir le signal stop introduit par la mutation rA en agissant à la manière d'un facteur anti-ρ (Roberts 1969). Le fait que cette "suppression" par le produit

N n'a pas lieu, ou reste faible, quand la transcription est déclenchée au niveau du promoteur cI7 (paragraphe 3) permet de repousser cette hypothèse et l'absence de "suppression" s'explique alors de façon très simple en admettant que l'effet stimulateur du produit N s'exerce en un site à gauche de cI7. L'absence de suppression dans le cas de la transcription déclenchée en cI7, montre en outre que celle-ci est insensible à une action du produit N.

En définitive la "suppression" constatée sur le bactériophage λ N7 N53 CI857 rA peut être expliquée de la façon suivante: en présence du produit N la transcription se ferait à un niveau suffisamment élevé (voir chapitre 2) pour franchir les barrières polaires rA et permettre l'expression des fonctions O et P.

IV - ETUDE DE MUTATIONS MODIFIANT OU ALTERANT LA REPLICATION DU BACTERIOPHAGE λ TOUT EN PERMETTANT L'EXPRESSION DE L'OPERON x O P

Chapitre 1 : Sélection de mutants du bactériophage λ N7 N53 CI857 qui n'ont pas d'effet létal sur la bactérie hôte et qui complémentent le bactériophage λ imm21 O P (mutants de la classe B et de la classe C).

§ 1. Principe de la sélection.

Pour chercher un mutant du seul gène réplicateur nous avions précédemment voulu sélectionner des mutants du bactériophage λ incapables de répliquer leur DNA tout en restant capables d'exprimer les fonctions O et P. Mais les mutants obtenus (classe A) ne répondent pas à ces deux critères en même temps. Ils n'expriment en effet les fonctions O et P qu'en présence du produit du gène N et ne sont incapables de répliquer leur DNA qu'en l'absence de ce produit. De tels mutants avaient pu être obtenus car la première étape de la sélection (obtention de dérivés du bactériophage λ N7 N53 CI857 qui n'ont plus d'effet létal sur la bactérie hôte) était faite en absence du produit du gène N et la seconde étape (recherche des dérivés chez qui un bactériophage λ imm434 O P peut se multiplier) était faite en présence du produit du gène N apporté par le bactériophage λ imm434 O P. Pour obtenir des mutants qui expriment, même en absence du produit du gène N, les fonctions O et P nous avons employé la sélection précédente mais en utilisant

dans la seconde étape, à la place d'un bactériophage λ imm434 O P qui possède le gène N de λ, un bactériophage λ imm21 O P qui ne possède pas ce gène et qui n'exprime pas de fonction interchangeable avec la fonction N (Couturier et Dambly 1970).

§ 2. Construction des bactériophages λ imm21 CI O29 P3 et λ imm21 CIts O29 P3.

Un stock d'un bactériophage λ imm21 O P étant nécessaire pour la seconde étape de la sélection le bactériophage λ imm21 CI O29 P3 est construit par croisement entre les bactériophages λ imm434 O29 P3 et λ imm21 CI O29. Mais il apparait que les stocks de bactériophages obtenus à partir d'un recombinant λ imm21 CI O29 P3 contiennent une grande proportion de réverses O^+ ou P^+. Pour obtenir de meilleurs stocks imm21 O P il est préférable d'induire une souche lysogène pour ce bactériophage. Pour construire une telle souche lysogène , un mutant thermoinductible du bactériophage λ imm21 est isolé.

Une culture de la souche 152(λ imm21), recA lysogène pour λ imm21 est traitée pendant deux heures à l'éthylméthanesulfonate, dans du milieu 63 en conditions saturantes, puis cultivée à 33°C en milieu complet pendant quelques générations pour laisser les mutations s'exprimer. Les bactéries, remises en milieu complet, sont agitées à 42°C pendant une heure pour que les bactériophages mutants thermoinductibles se développent. Effectivement on trouve dans la suspension obtenue quelques bactériophages qui forment à 42°C des plages de lyse claires et à 33°C des plages de lyse troubles. L'un de ces bactériophages est isolé et nommé λ imm21 CIts. Une souche lysogène pour ce bactériophage λ imm21 CIts conduit à une lyse

complète après agitation à 41°C en milieu complet (et la thermosensibilité est réversible). Le bactériophage recombinant λ imm21 CIts O29 P3 est alors construit à partir du bactériophage λ imm434 O29 P3 et la souche su C600 est lysogénisée. L'induction de la souche lysogène obtenue permet d'obtenir désormais des stocks de bactériophages λ imm21 CIts O29 P3.

§ 3 Obtention des mutants. Classe B et classe C.

La sélection est faite comme précédemment (Matériel et Méthodes II,4,1) avec pour souches lysogènes soit 3000x64(λ N7 N53 CI857), soit W3350(λ N7 N53 CI857), soit M72(λ N7 N53 CI857) et dans la seconde étape, au lieu de bactériophages λ imm434 O P, des bactériophages λ imm21 O P. La concentration des bactériophages λ imm21 O P est critique car il est nécessaire que les répliques des colonies étudiées soient infectées par un nombre suffisant de bactériophages O P mais il ne faut pas que la concentration des réverses O^+ ou P^+ soit trop élevée. En pratique on obtenait de bons résultats en répliquant les colonies sur des boites où 10^7 bactériophages ont été étalés.

Les diverses souches soumises à la sélection donnent des résultats similaires: environ 1 bactérie parmi 1000 survivantes à l'induction thermique est lysée par le bactériophage λ imm21 O P et répond donc au critère de sélection. Des bactéries mutantes issues d'isolements indépendants sont réisolées et conservées; le tableau 10 indique l'origine de certaines d'entre elles.

Tableau 10. Bactéries mutantes sélectionnées à l'aide d'un bactériophage λ imm21 O P.

Nom attribué à la mutation	souche parentale	Bactériophage O P employé pour la sélecti
r34	3000x64(λ N7 N53 CI857)	λ imm21 CI O29 P3
r55	W3350rec(λ N7 N53 CI857)	"
r56	"	λ imm21 CIts O29 P3
r57	"	"
r58	"	"
r60	"	"
r70	M72(λ N7 N53 CI857)	"
r77	"	"
r80	"	"
r85	"	"
r93	"	"
r94	"	"
r95	"	"
r96	"	"
r97	"	"
r98	"	"
r99	"	"

Un premier test effectué sur les bactéries lysogènes mutantes montre qu'on en trouve de deux types: celles dont le prophage peut se multiplier dès que la souche est rendue su (Matériel et Méthodes II,4,5) ou dès que le prophage est transporté dans une souche su, et celles dont le prophage reste défectif dans ces conditions. Les mutations r56, r57, r77 et r80 sont du premier type et définissent la classe B tandis que les autres définissent la classe C. Ces deux classes ne sont d'ailleurs pas nécessairement homogènes: les mutants qui les forment peuvent varier par d'autres propriétés.

Chapitre 2 : Etude des mutants de la classe B.

§ 1. Analyse fonctionnelle des mutants.

Les bactériophages mutants de la classe B sont les dérivés du bactériophage λ N7 N53 CI857 qui n'ont plus d'effet létal sur la bactérie hôte, qui complémentent un bactériophage λ imm21 O P et qui ne sont plus défectifs dès qu'ils sont dans une souche su. Les mutations sont appelées rB. Elles sont virales car un prophage mutant de la classe B conserve ses propriétés lorsqu'il est transporté dans une autre souche bactérienne.

D'après la manière dont ils sont sélectionnés les bactériophages de la classe B doivent pouvoir exprimer les fonctions O et P. Effectivement des mesures quantitatives montrent qu'ils complémentent les bactériophages λ imm21 O

et λ imm21 P avec un efficacité égale et peut-être même supérieure à celle du bactériophage parent λ N7 N53 CI857 (tableau 11). Les mutations rB ne supprimeraient donc pas l'expression des fonctions O et P.

Les produits CII et cro, dont les gènes appartiennent à la même unité d'expression que les gènes O et P, sont aussi synthétisés chez les bactériophages mutants de la classe B. En effet, d'une part les bactériophages mutants, comme le parent λ N7 N53 CI857, ont un phénotype trouble lorsqu'ils sont étalés sur une souche indicatrice su à 33°C. D'autre part les bactéries lysogènes pour ces mutants perdent "irréversiblement" l'immunité si elles sont cultivées à 42°C ce qui révèle l'expression de la fonction cro (Matériel et Méthodes II,4,3,2) et montre au passage que le répresseur CI est toujours thermosensible. Le résultat le plus important de l'analyse fonctionnelle des mutants de la classe B est l'expression des fonctions réplicatives O et P mais il est essentiel de s'assurer que les prophages λ N7 N53 CI857 rB expriment ces fonctions par eux mêmes et qu'il ne s'agit pas d'un artifice dû à la présence des bactériophages surinfectants λ imm21 O/ P. Aussi nous avons réalisé une expérience où l'expression des fonctions O et P est mesurée en l'absence du produit N et sans surinfection par un bactériophage λ imm21 O/ P.

§ 2. Mesure indirecte de complémentation des fonctions O et P en l'absence du produit N.

Pour mesurer l'expression des fonctions O et P, au lieu d'observer directement la croissance des bactériophages

Tableau 11. Expression des fonctions O et P par un prophage rB.

Souche surinfectée	Production de bactériophages surinfectants (par bactérie initiale)	
	imm21 CI O29	imm21 CI P3
W3350rec(λ N7 N53 CI857)	3	30
W3350rec(λ N7 N53 CI857 r57)	10	60

O (ou P) surinfectants on observe ici indirectement la réplication de bactériophages pgal O (ou P). La mesure repose sur les propriétés du bactériophage λ N pgal décrites par Signer (1969): un bactériophage λ N pgal infectant une bactérie s'y réplique sous forme de plasmide. L'opéron Gal porté par ce plasmide peut s'exprimer. Aussi, lorsqu'une bactérie gal est infectée par un bactériophage λ N pgal elle devient capable d'utiliser le galactose comme source de carbone et donne naissance à un clone gal$^+$: la souche gal est convertie en gal$^+$ par le bactériophage λ N pgal. Cette conversion qui nécessite la réplication du bactériophage λ N pgal peut servir à mesurer indirectement l'expression des fonctions réplicatives O et P du prophage d'une bactérie lysogène gal. En effet, pour convertir cette bactérie en bactérie gal$^+$, non plus par un bactériophage λ N pgal mais par un bactériophage λ N O pgal (ou λ N P pgal) il faut que le prophage apporte la fonction O (ou P). Ainsi selon qu'une souche lysogène gal est convertie ou non en gal$^+$ par un bactériophage λ N O pgal (ou λ N P pgal) il est possible de savoir si le prophage exprime ou non la fonction O (ou P).

Le bactériophage λ N7 N53 CI857 P pgal convertit en gal$^+$ une souche gal lysogène pour un prophage de la classe B (tableau 12). Cela est dû à une complémentation des bactériophages λ N7 N53 CI857 P pgal et non à l'apparition de quelques recombinants gal$^+$: en effet la complémentation reste très efficace aux basses concentrations et des gouttes d'une suspension de bactériophages très diluée déposés sur une souche indicatrice gal donnent un nombre de colonies gal$^+$ sensiblement égal au nombre de bactériophages contenus dans les gouttes. Ainsi même en absence de la fonction N, même sans surinfection par un bactériophage

Tableau 12. Conversion en gal$^+$ de souches gal par le bactériophage λ N7 N53 CI857 P gal.

Souche gal étudiée	Croissance sur galactose
W3350	-
W3350(λ N7 N53 CI857 P3)	-
W3350(λ N7 N53 CI857 x13)	-
W3350(λ N7 N53 CI857 r14) type rA	-
W3350(λ N7 N53 CI857 r57) type rB	+

0,05 ml de suspensions du bactériophage transducteur λ N7 N53 CI857 P3 gal de diverses concentrations (100, 1000 et 10 000 particules / ml) sont déposés sur les bactéries étalées (à raison de 10^8 bactéries par boite) sur un milieu de croissance contenant du galactose comme seule source de carbone. Les boites sont ensuite incubées à 42°C et examinées après une journée.

λ imm21, un prophage de la classe B exprime la fonction réplicative P. Selon toute vraisemblance il en est de même de l'autre fonction réplicative, O. On peut se demander si le bactériophage porteur de la mutation rB n'est pas demeuré capable de répliquer son DNA en l'absence de N, en dépit du fait que comme prophage il n'exerce plus d'effet létal sur la bactérie hôte après induction à 42°C.

§ 3. Réplication à l'état N^-.

Pour étudier la capacité à se répliquer des bactériophages de la classe B nous avons utilisé le phénomène de conversion d'une bactérie gal en gal^+ par un bactériophage λ N pgal. La conversion n'est possible que si le bactériophage transducteur peut se répliquer (voir paragraphe précédent). Un bactériophage de la classe B est rendu transducteur par croisement avec un bactériophage pgal et sa capacité à convertir une souche gal est examinée. Effectivement le bactériophage recombinant λ N7 N53 CI857 r57 pgal convertit une souche RecA gal en gal^+. La présence de la mutation rB chez un bactériophage λ N7 N53 CI857 ne lui interdit donc pas de se multiplier.

§ 4. Discussion.

Nous avons supposé, suivant Eisen, Pereira da Silva et Jacob (1968) que la réplication du prophage est la cause de l'effet létal sur la bactérie hôte lors de l'induction d'un prophage λ N. Cette hypothèse repose

sur l'existence d'une réplication dirigée par le prophage λ N et sur le fait que les bactéries qui survivent à l'induction portent des prophages mutés de telle sorte qu'ils ne peuvent plus se répliquer: de type O, P ou x. Les bactériophages mutants de la classe A et de la classe B proviennent aussi de bactéries lysogènes qui ont survécu à l'induction. Ceux de la classe A, comme les mutants O, P ou x, ne peuvent pas se répliquer, du moins dans les conditions où se fait l'induction, en l'absence du produit N.

Peut-être alors la réplication du prohage λ N n'est-elle pas la cause de l'effet létal qui serait dû à un autre phénomène dans lequel les fonctions O et P interviendraient.

Mais si la réplication est bien la cause de l'effet létal les propriétés des mutants de la classe B peuvent s'expliquer de deux manières. Ou bien la réplication de ces bactériophages en l'absence de N, observée sur les plasmides, est bloquée quand le génome est intégré comme prophage. Ou bien la réplication est transformée chez ces mutants et devenue compatible avec la survie des bactéries hôtes. Des résultats obtenus sur les mutants de la classe B (Ph. Brachet, communication personnelle) sont en faveur de cette dernière hypothèse et seront discutés plus loin.

Chapitre 3 : Etude des mutants de la classe C.

§ 1. Analyse fonctionnelle des mutants.

Les bactériophages mutants de la classe C sont les dérivés du bactériophage λ N7 N53 CI857 qui n'ont plus d'effet létal sur la bactérie hôte, qui complémentent un bactériophage λ imm21 O P et qui restent défectifs dans une souche su. Les mutations sont appelées rC.

Les prophages de la classe C doivent, par sélection, pouvoir exprimer les fonctions O et P. Effectivement des mesures quantitatives montrent qu'ils complémentent les bactériophages λ imm21 O et λ imm21 P plutôt mieux que le témoin lysogène pour le bactériophage parent λ N7 N53 CI857 (tableau 13). Les mutations rC n'interdisent pas non plus l'expression des produits CII et cro, dont les gènes appartiennent à la même unité d'expression que les gènes O et P. En effet d'une part les prophages mutants complémentent des bactériophages CII et expriment donc la fonction CII et d'autre part les bactéries lysogènes pour ces mutants perdent "irréversiblement" l'immunité si elles sont cultivées à 42°C ce qui révèle l'expression de la fonction cro (Matériel et Méthodes II,4,3,2). Enfin les bactériophages λ imm434 CII Q203, λ imm434 CII R216, λ CI857 F204 forment des plages de lyse lorsqu'ils sont étalés sur les bactéries lysogènes pour les mutants de la classe C. Ceux-ci peuvent donc exprimer les fonctions Q, R et F.

Tableau 13. Expression des fonctions O et P par les prophages défectifs rC.

Souche surinfectée	Production de bactériophages surinfectants (par bactérie initiale)	
	imm21 CI O29	imm21 CI P3
W3350rec(λ N7 N53 CI857)	3	30
W3350rec(λ N7 N53 CI857 r58)	25	70

Des tests qualitatifs indiquent qu'il y a complémentation similaire avec les autres prophages rC.

§ 2. La mutation défective est localisée sur le bactériophage.

Le caractère défectif des mutants de la classe C peut résulter d'une mutation virale ou d'une mutation bactérienne. Si les mutations rC sont bactériennes les souches lysogènes mutantes qui seraient guéries de leur prophage puis relysogénisées par le bactériophage parent λ N7 N53 CI857 doivent toujours survivre à l'induction thermique.

Or les bactéries lysogènes de la classe C, guéries de leur prophage par surinfection par un bactériophage λ imm21 b2 (Matériel et Méthodes II,4,6) puis relysogénisées par le bactériophage λ N7 N53 CI857 sont toutes tuées lorsqu'elles sont cultivées à 42°C. Les mutations rC ne sont donc pas bactériennes et doivent être portées par les prophages.

De plus, dans cette expérience, l'étape de guérison par un bactériophage surinfectant λ imm21 b2 montre que les prophages de la classe C peuvent être excisés lorsque les produits diffusibles nécessaires, int et xis, sont apportés par un autre bactériophage. Nous avons voulu savoir si les prophages de la classe C étaient capables de s' "autoexciser", c'est à dire de fournir les fonctions d'excision et de s'exciser par eux-mêmes.

§ 3. Propriétés d'excision des mutants.

La possibilité de guérison de bactéries lysogènes pour des mutants de la classe C reflèterait la capacité des prophages à s'exciser. Le taux de guérison a donc été mesuré pour estimer l'activité des fonctions d'excision.

L'expérience est réalisée dans des dérivés su (Matériel et Méthodes II,4,5) pour que les mutations ambre N7 et N53 soient corrigées et qu'ainsi l'expression des fonctions d'excision (int et xis), dépendant du produit du gène N, puisse se faire. Après un passage bref en conditions d'induction, seules certaines souches ont fréquemment perdu leur prophage (tableau 14). Les autres, dont les prophages portent les mutations r70 et r85, sont restées lysogènes. Apparemment les prophages de la classe C qui peuvent tous être excisés lors de la surinfection par le bactériophage λ imm21 b2 ne le peuvent pas tous par eux-mêmes.

§ 4. Les mutations rC ne sont pas complémentées par un allèle sauvage en position trans.

Les mutants de la classe C sont défectifs. Leur manque-t-il seulement une fonction diffusible qui pourrait être apportée par un bactériophage surinfectant ou bien au contraire les mutations rC agissent elles en cis ? L'étude de la multiplication des mutants de la classe C lors d'une surinfection par d'autres bactériophages doit répondre à cette question. Mais la multiplication de bactériophages défectifs n'est pas facile à observer car les suspensions de ces bactériophages ne peuvent être titrées par étalement sur une souche indicatrice et dénombrage de plages de lyse. Pour mesurer cette réplication des bactéries lysogènes pour les mutants de la classe C sont surinfectées par un bactériophage dont la densité diffère de celle des mutants, le bactériophage λ b2 CI dans un milieu contenant un traceur radioactif du DNA (figure 8). Ainsi les bactériophages produits

Tableau 14. Guérison en conditions su des bactéries lysogènes pour les mutants de la classe C.

Prophage étudié	% de bactéries guéries
λ N7 N53 CI857	30 %
λ N7 N53 CI857 r70	moins de 5 %
λ N7 N53 CI857 r85	moins de 5 %
λ N7 N53 CI857 r93	50 %
λ N7 N53 CI857 r94	50 %
λ N7 N53 CI857 r95	50 %
λ N7 N53 CI857 r96	50 %
λ N7 N53 CI857 r97	50 %
λ N7 N53 CI857 r98	50 %
λ N7 N53 CI857 r99	50 %

Les cultures des souches su lysogènes sont portées 5 min à 42°C, puis diluées et étalées à 33°C. On tient pour guéris les clones qui ne sont pas immuns.

sont marqués. Séparés ensuite selon leur densité ils peuvent être comptés d'après la radioactivité. On peut ainsi savoir quels bactériophages se sont multipliés et l'on a vu plus haut que l'excision, étape qui précède la réplication, est possible pour les mutants rC. Les résultats, présentés dans le tableau 15, montrent qu'un bactériophage O, qui a besoin de la fonction O, et qu'un bactériophage rA, qui a besoin de la fonction N, peuvent se multiplier en présence du bactériophage λ b2 CI tandis qu'un bactériophage x et un bactériophage rC ne le peuvent pas. La mutation rC confère donc au bactériophage qui la porte un défaut de multiplication que ne corrigent pas les fonctions réplicatives apportées par le bactériophage λ b2 CI.

§ 5. Expression d'une fonction tardive, le lysozyme, chez les mutants.

Mesurer l'expression du lysozyme chez les bactériophages mutants de la classe C peut apporter un renseignement sur leur capacité à se répliquer. En effet l'expression quantitative du lysozyme, fonction tardive, dépend du nombre de copies du gène R, gène de structure du lysozyme, et dépend donc indirectement de la réplication virale (Dambly, Couturier et Thomas 1968). La synthèse de lysozyme est mesurée (Matériel et Méthodes II,4,3,3) chez diverses bactéries lysogènes en présence du produit du gène N car l'expression du gène R dépend aussi de la fonction N. Les résultats (tableau 16) indiquent que le témoin CI857 P80 qui ne se réplique pas et possède donc le gène R à un seul exemplaire, synthétise peu (3 %) de

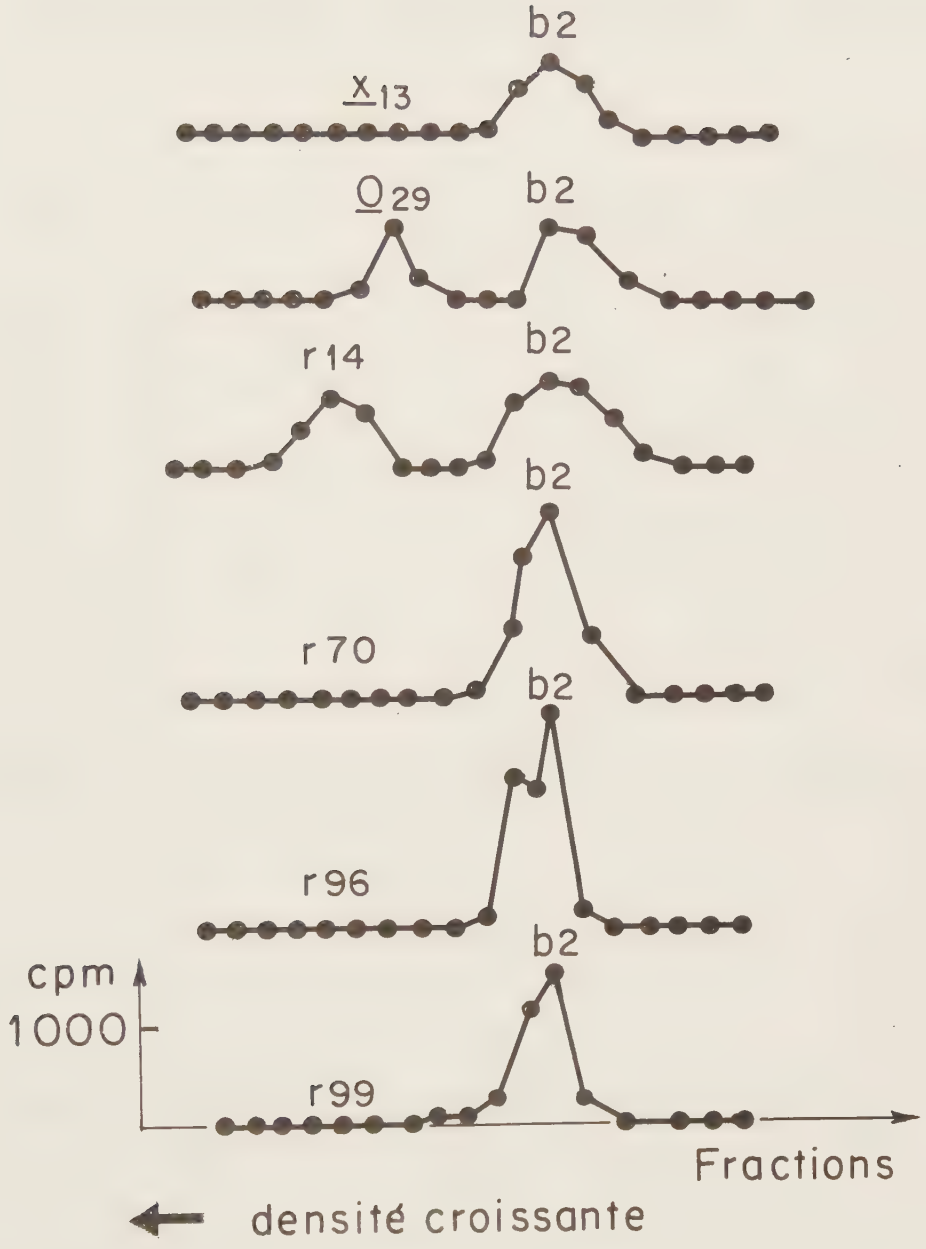


Figure 8: Radioactivité incorporée dans les lysats des mutants rC surinfectés par le bactériophage λ b2 CI.

Les bactéries lysogènes pour les mutants de la classe C, et pour un mutant de la classe A, sont surinfectées par un bactériophage λ b2 CI dans un milieu complet additionné de thymidine tritiée.

Tableau 15. Incorporation dans le DNA de prophages surinfectés par λ b2 CI.

Prophage	radioactivité incorporée
λ N7 N53 CI857 O8	1
λ N7 N53 CI857 x13	moins de 0,01
λ N7 N53 CI857 r70	moins de 0,01
λ N7 N53 CI857 r96	moins de 0,01
λ N7 N53 CI857 r99	moins de 0,01
λ N7 N53 CI857 r14	1

L'unité employée est l'incorporation dans les bactériophages λ b2 CI. Les valeurs indiquées ont été obtenues d'après les résultats représentés sur la figure 8.

Tableau 16. Synthèse de lysozyme par des mutants rC.

Prophage	Activité lysozyme 60 min (Matériel et Méthodes II,4,3,3)
λ CI857 P	85
λ N7 N53 CI857 r70	150
λ N7 N53 CI857 r96	350
λ N7 N53 CI857 r99	260
λ N7 N53 CI857	2900

lysozyme par rapport au témoin N7 N53 CI857 qui se réplique. Ils indiquent aussi que les mutants de la classe C, comme le bactériophage P, synthétisent peu de lysozyme (de 7 à 13 %).

§ 6. Production de stocks de bactériophages mutants.

Lorsqu'elles sont induites, les bactéries lysogènes de la classe C ne produisent pas de particules capables de faire des plages de lyse. Il a été néanmoins possible d'obtenir des stocks de bactériophages rC: l'induction thermique des dérivés su de bactéries lysogènes de la classe C conduit à la lyse et l'on peut mettre en évidence la présence de bactériophages dans les lysats obtenus en utilisant ceux-ci dans des croisements avec un prophage λ défectif et en observant la production de recombinants. La concentration en particules virales défectives peut être estimée par défaut d'après le nombre de recombinants trouvés après croisement avec, par exemple, la bactérie lysogène ΔM25su qui porte une délétion du prophage (dernière colonne du tableau 20). On peut penser que les particules obtenues dans les lysats contiennent les molécules de DNA du prophage mutant rC. Nous avons pu obtenir des suspensions concentrées de ces particules à l'aide des techniques classiques de centrifugation préparative de bactériophages. Les mesures des densités optiques des suspensions concentrées ont permis d'estimer assez directement le nombre de particules virales dans les lysats initiaux, qui était de l'ordre de 3 bactériophages par bactérie induite.

§ 7. Localisation des mutations rC.

Les prophages mutants de la classe C sont croisés

avec des bactériophages connus pour localiser les mutations défectives rC que contiennent ces prophages.

Quatre prophages N CI857 rC, ainsi qu'un prophage N CI857 O sont croisés avec un bactériophage λ imm434 CII P (figure 9a). Les bactériophages du lysat qui forment des plages et sont P^+, sont examinés; ils résultent d'une recombinaison génétique puisque les bactériophages parents étaient soit défectifs rC, soit P. Sur 35 recombinants observés, 34 sont N^+ imm434 CII et 1 est N immλ CII^+ : les marqueurs N, immunité et CII ont donc ségrégé ensemble dans ce croisement, c'est à dire n'ont été disjoints chez aucun recombinant. Ceci indiquerait qu'aucun de ces trois marqueurs ne se trouve entre les marqueurs rC et P. De plus, la combinaison N^+ imm434 CII étant beaucoup plus fréquente que la combinaison N immλ CII^+, le marqueur rC doit être à gauche du marqueur P suivant l'orientation de la figure. La mutation rC doit donc se trouver entre les mutations CII3057 et P3.

Les prophages de la classe C sont croisés avec le bactériophage λ imm21. L'existence de recombinants dont l'immunité est celle du prophage montre (figure 9b) que la mutation rC se trouve hors de la région imm21.

Deux prophages de la classe C sont croisés avec un bactériophage λ imm21 O. Les bactériophages recombinants formant des plages et O^+ sont examinés (figure 9c). Ces recombinants ayant l'immunité de 21 le marqueur rC doit être à gauche du marqueur O. La mutation rC doit donc se trouver à gauche de la mutation O29 qui est elle même très à gauche dans le gène O.

Ces résultats indiquent que les mutations rC doivent se trouver entre la région imm21 et la mutation O29. Ce résultat est en accord avec le croisement suivant

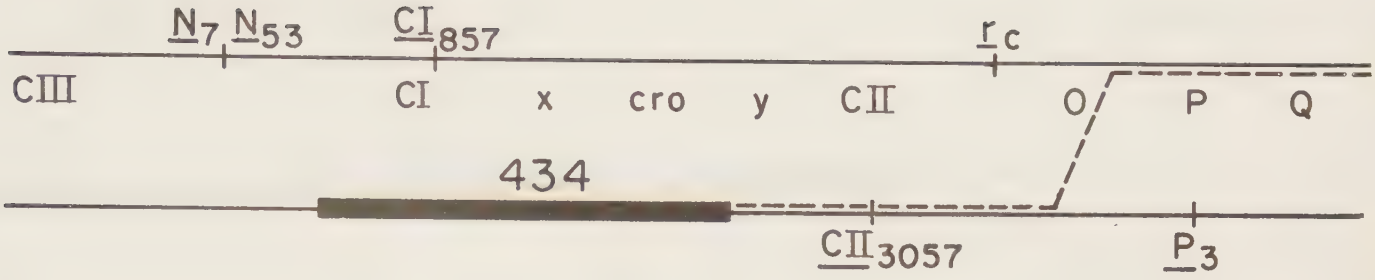


Figure 9a: Localisation des mutations rC par rapport aux mutations CII3057 et P3.

Les bactéries M72(λ N7 N53 CI857 r70), M72 (λ N7 N53 CI857 r85), M72(λ N7 N53 CI 857 r96), M72 (λ N7 N53 CI857 r99) et M72(λ N7 N53 CI857 OA) où OA est une mutation du gène O sont surinfectées à 42°C par le bactériophage λ imm434 CII3057 P3. Les lysats obtenus sont étalés sur la souche indicatrice QD5003 dont le suppresseur, supF, corrige les mutations N7 N53 mais non P3 (Thomas et al. 1967). 7 bactériophages recombinants P^+ de chaque croisement sont examinés. Sur ces 35 recombinants 34 sont N^+ imm434 CII et 1 est N immλ CII^+.

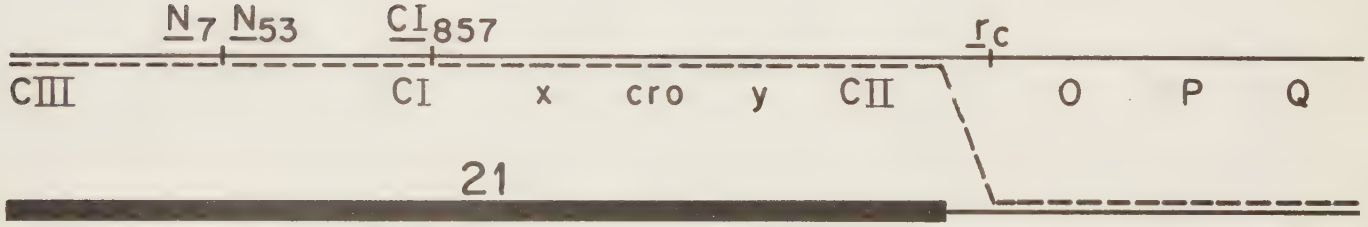


Figure 9b: Localisation des mutations rC par rapport à la région imm21.

Les bactéries lysogènes pour les mutants de la classe C sont surinfectées par le bactériophage λ imm21. Les lysats obtenus sont étalés sur la souche indicatrice su C600 (λ imm21) qui ne permet la croissance que de bactériophages ayant l'immunité de λ . La production de tels recombinants est environ une particule pour 1000 bactéries infectées.

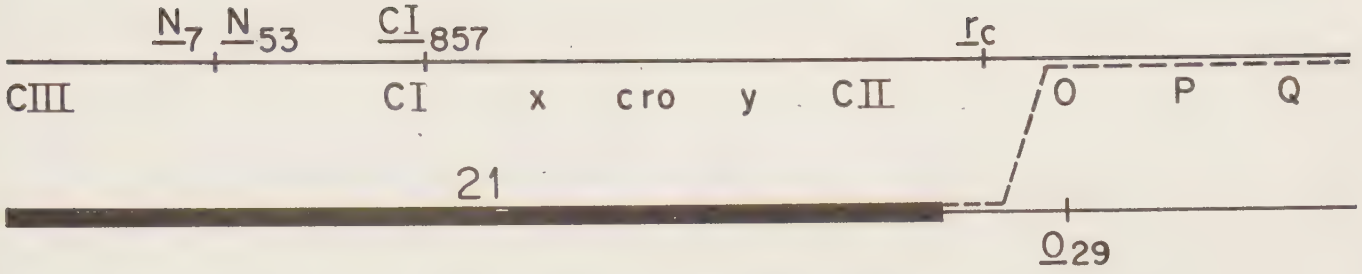


Figure 9c: Localisation des mutations rC par rapport à la mutation O29.

Les bactéries M72(λ N7 N53 CI857 r70) et M72(λ N7 N53 CI857 r93) sont surinfectées à 42°C par le bactériophage λ imm21 CIts O29. Les lysats obtenus sont étalés sur la souche indicatrice M5220 qui ne porte pas de suppresseur et exprime la fonction N (souche de H.Green). Les bactériophages recombinants O^+, obtenus à une fréquence 1/1000 parmi les bactériophages produits, ont la région d'immunité de 21.

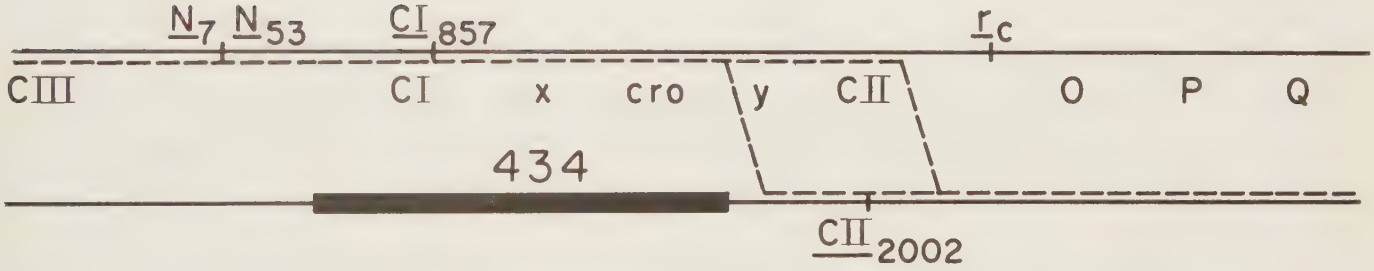


Figure 9d: Localisation des mutations rC par rapport à la mutation CII2002.

Les bactéries M72(λ N7 N53 CI857 r70), M72(λ N7 N53 CI857 r85), M72(λ N7 N53 CI857 r96), M72(λ N7 N53 CI857 r99), M72(λ N7 N53 CI857 OA) et M72(λ N7 N53 CI857 PB), où OA et PB sont des mutations des gènes O et P, sont surinfectées à 42°C par le bactériophage λ imm434 CII2002. Les lysats obtenus sont étalés à 35°C sur la souche indicatrice C600(λ imm434) qui n'autorise la croissance que des bactériophages ayant l'immunité de λ.

qui localise les mutations rC non loin de la mutation OA et au centre du segment CII2002-PB (OA et PB sont deux mutations spontanées des gènes O et P qui ont été isolées pour ce travail). Les prophages λ N CI857 rC, λ N CI857 OA et λ N CI857 PB sont croisés avec le bactériophage λ imm434 CII2002. Les plages formées par des bactériophages recombinants ayant l'immunité du prophage sont étudiées (figure 9d). La proportion des recombinants de phénotype CII^+ mesure la distance entre la mutation défective et la mutation CII car une recombinaison entre ces deux mutations est nécessaire pour former un recombinant CII^+. Le rapport de recombinants immλ CII^+ r^+ / immλ CII r^+ est 15,7 pour la mutation PB (tableau 17), 6,9 pour la mutation OA, 6,3 pour la mutation r70, 5,4 pour la mutation r85, 7,5 pour la mutation r96 et 5 pour la mutation r99. Les mutations rC doivent donc se trouver non loin de la mutation OA et au centre du segment CII2002-PB.

Les résultats obtenus sont en accord avec une localisation des mutations rC dans une région que l'on peut nommer rep, située à droite du gène CII et à gauche du gène O.

Cette localisation a été confirmée par la méthode de "mapping par délétions" avec quatre souches bactériennes qui dérivent de bactéries lysogènes pour λ N7 N53 CI857 (Castellazi, Brachet et Eisen 1972) et qui portent des délétions partant soit de la région gal, soit de la région bio et allant soit jusqu'au marqueur CII, soit jusqu'au marqueur O. Les bactéries lysogènes porteuses de ces délétions sont surinfectées avec les stocks de particules de bactériophages rC et les résultats des

Tableau 17. Recombinants immλ r^+ des croisements λ N7 N53 CI857 r x λ imm434 CII2002, où r représente une mutation PB, OA ou rC.

mutation additionnelle r	nombre de bactériophages immλ CII$^+$ r^+	nombre de bactériophages immλ CII r^+	rapport immλ CII$^+$ r^+ / immλ CII r^+
PB	657	42	15,7
OA	803	116	6,9
r70	339	54	6,3
r85	584	109	5,4
r96	328	44	7,5
r99	50	10	5

croisements (tableau 18) montrent que les mutations rC se trouvent entre les marqueurs CII3031 et O8 (figure 10).

§ 8. Mesure de la densité des mutants.

Certaines mutations (délétions, insertions...) peuvent modifier la densité du bactériophage qui les porte. Si les mutations rC sont dues, par exemple, à des insertions de DNA dans le chromosome on s'attend à une augmentation de la longueur du chromosome et, en même temps, de la densité des particules correspondantes (voir Partie III, Chapitre 3, Paragraphe 6).

Des stocks de bactériophages λ N7 N53 CI857 rC ont été concentrés par ultracentrifugation préparative. Le profil de sédimentation du mélange λ N7 N53 CI857 rC, λ b2 CI et λ N7 N53 CI857 r32 a été examiné en ultracentrifugation analytique. Les bactériophages λ b2 CI et λ N7 N53 CI857 r32 servaient respectivement de marqueurs léger et lourd de densité. Il apparut (tableau 19, figure 11) que les stocks des mutants rC avaient des densités supérieures à celle du bactériophage parental N7 N53 CI857 et que la différence était dans plusieurs cas supérieure à la fidélité de la mesure de densité: la fidélité de la mesure de densité correspond à environ 35 paires de base. Cette fidélité, déterminée en répétant la centrifugation d'un même stock plusieurs fois, est ici exceptionnellement bonne car on emploie deux marqueurs de référence. Il paraissait donc que la taille du chromosome des mutants rC était légèrement supérieure à celle du parent. Mais une nouvelle préparation du bactériophage N7 N53 CI857 a été faite et le stock obtenu (désigné λ N7 N53 CI857 *) avait, lui aussi, une densité supérieure à celle du

Tableau 18. Localisation des mutations rC à l'aide de bactéries lysogènes porteuses de délétions du prophage.

Délétion du prophage	marqueur étudié							
	gal	cro	CII3031	rC	O29	O8	P	bio
ΔX3	-	-	-	+	+	+	+	+
ΔX6	-	-	-	-	-	+	+	+
ΔF3	+	+	+	-	-	-	-	-
ΔM25	+	+	+	+	+	-	-	-

Les signes (+) ou (-) indiquent la présence ou l'absence du marqueur étudié dans les souches bactériennes porteuses des quatre délétions du prophage (Castellazi, Brachet et Eisen 1972).

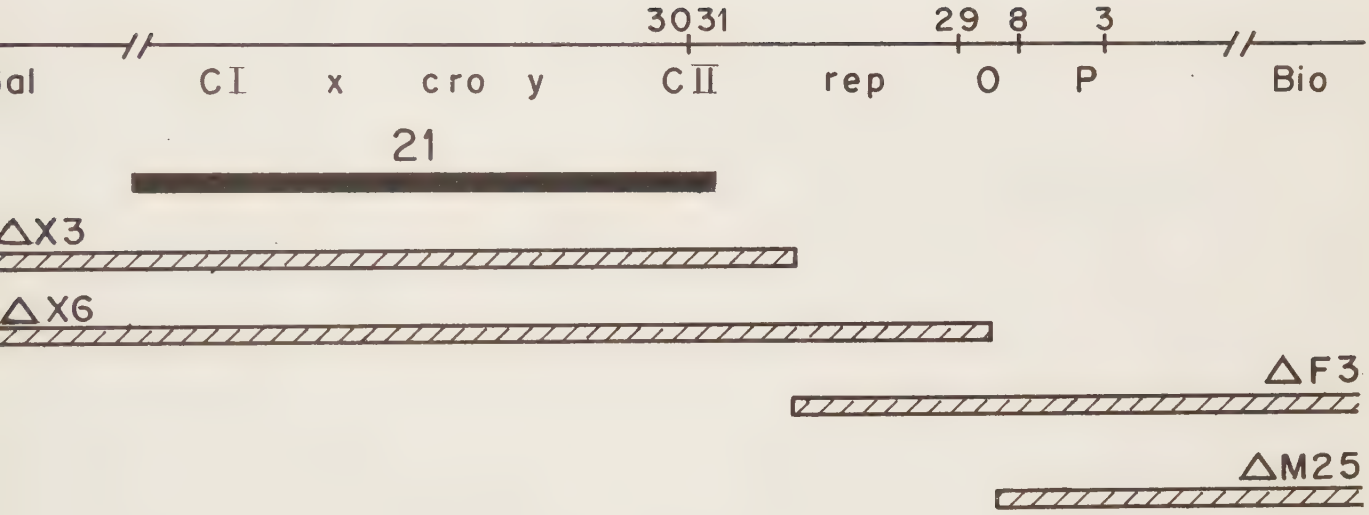


Figure 10: Localisation du gène rep.

La région d'immunité du bactériophage 21 est représentée en noir et les quatre délétions en hachuré (Castellazi, Brachet et Eisen 1972).

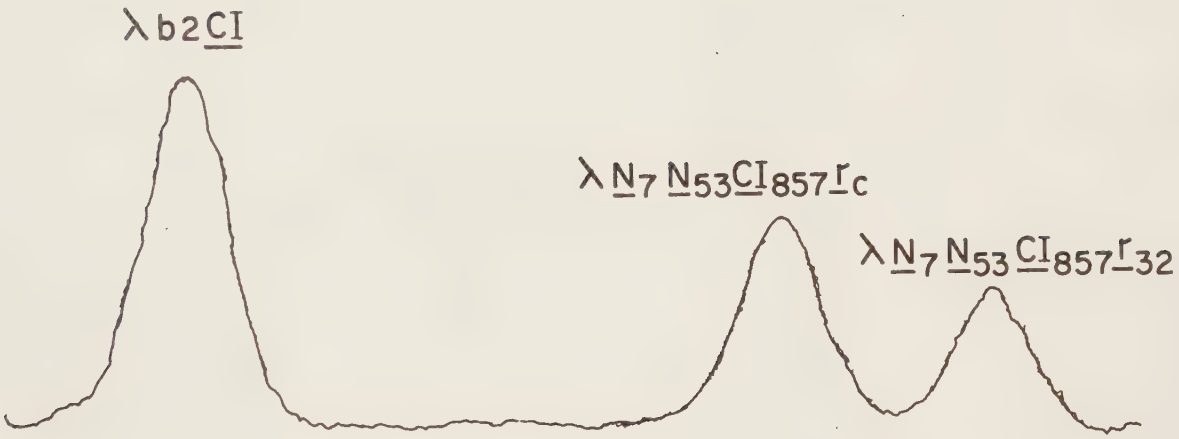


Figure 11: Profil de sédimentation en ultracentrifugeuse analytique d'un mélange des bactériophages λ b2 CI, λ N7 N53 CI857 r32 et λN7 N53 CI857 rC.

La figure représente le tracé du lecteur photoélectrique le long d'un gradient d'équilibre en CsCl, dans une ultracentrifugeuse analytique Spinco, le rotor tournant à 26.000 t/mn.

Tableau 19. Densité des bactériophages mutants rC.

Mutant étudié	variation de densité		densité
	en équivalents de paires de base	en g / cm3	
λ N7 N53 CI857	0	0	1,5061
λ N7 N53 CI857 r93	70	0,0002	1,5063
λ N7 N53 CI857 r94	0	0,0000	1,5061
λ N7 N53 CI857 r95	7	0,0000	1,5061
λ N7 N53 CI857 r96	140	0,0004	1,5065
λ N7 N53 CI857 r97	168	0,0005	1,5066
λ N7 N53 CI857 r98	91	0,0003	1,5064
λ N7 N53 CI857 r99	35	0,0002	1,5063
λ N7 N53 CI857 *	250	0,0007	1,5068

-Les mesures sont faites à partir d'un gradient de CsCl, dans une ultracentrifugeuse analytique Spinco, le rotor tournant à 26 000 t/mn.
-Les résultats sont obtenus à partir des tracés du lecteur photo-électrique, la lecture se faisant par comparaison avec une cellule de référence ne contenant pas de bactériophage et tournant dans le même rotor (figure 11).
-Le calcul est fait par interpolation avec les repères λ b2 CI et λ N7 N53 CI857 r32.

stock initial (tableau 19). Nous avions donc observé que, d'une préparation à l'autre, la densité d'un bactériophage peut varier d'une quantité qui équivaudrait à 250 paires de base (tableau 19). Nous ne savons d'ailleurs pas quel facteur détermine cette variabilité. Celle-ci est tout de même faible étant donné la taille du chromosome de λ qui contient environ 50 000 paires de base.

Finalement ces observations n'ont pas permis de mettre en évidence de différence entre la longueur du chromosome des mutants rC et celle du chromosome parental. Elles montrent que, s'il y a une différence, celle-ci ne dépasse pas 250 paires de bases.

§ 9. Discussion.

Les prophages mutants rC ne tuent pas la bactérie hôte après induction en l'absence de N ce qui indiquerait qu'ils ne peuvent pas répliquer leur DNA. Ces prophages peuvent cependant exprimer les deux produits diffusibles nécessaires à la réplication du DNA de λ, O et P. Par ailleurs, en présence du produit N, les bactériophages mutants ne peuvent se multiplier, même en présence de bactériophages rC^+. De plus le lysozyme, fonction tardive de λ et dont la quantité produite dépend de la réplication des gènes du bactériophage, n'est exprimé qu'à un taux très bas chez les prophages rC (induction en présence du produit N). Enfin les prophages rC peuvent être excisés.

Ainsi les mutations rC bloqueraient la réplication du DNA du bactériophage qui les porte et agiraient en position cis. Comme elles n'altèrent aucun gène étudié

(cro, CII, O et P) on peut penser qu'elles altèrent le réplicateur du bactériophage λ, site régulateur proposé dans le modèle du réplicon (Jacob, Brenner et Cuzin 1963). Aussi nous avons renommé ces mutations du symbole rep. Deux méthodes différentes ont permis de localiser les mutations rep entre les marqueurs CII et O. Nous proposons donc que le réplicateur du bactériophage λ se situe entre les gènes CII et O. Néanmoins, on ne peut exclure l'hypothèse suivant laquelle les mutations rep altéreraient une protéine de réplication du bactériophage λ, encore inconnue, agissant en position cis comme celle que Lindhal (1970) a observée chez le bactériophage P2.

Chapitre 4 : Analyse génétique des mutants de la classe C (mutants rep).

§ 1. Recombinaison entre les mutants rep et λ imm21. Propriétés d'un recombinant (nommé λ imm21 rep).

Ayant observé plus haut que les mutations rep sont en dehors de la région de non-homologie imm21, nous avons essayé de les transporter sur le bactériophage λ imm21.

Pour construire des recombinants de type λ imm21 rep les prophages λ N7 N53 CI857 rep ont été croisés avec le bactériophage λ imm21 CIts O29 P3 (figure 12) et les lysats ont été étalés sur la souche indicatrice

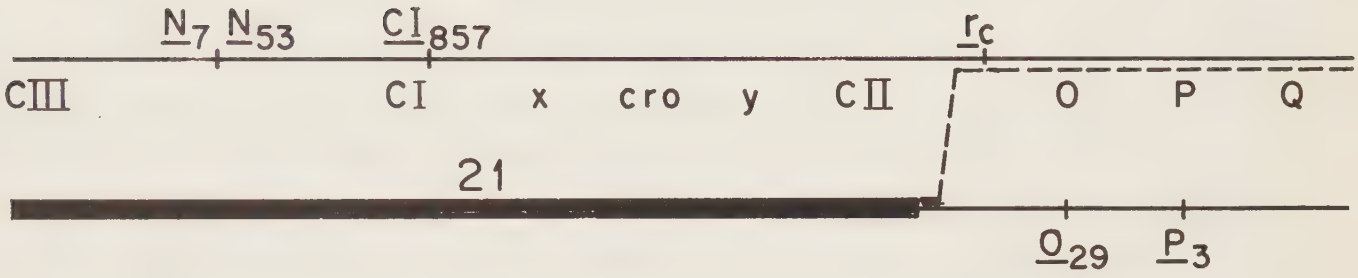


Figure 12: Construction du bactériophage λ imm21 rep.

W3350, qui ne porte pas de suppresseur, à 37°C. A cette température le bactériophage λ imm21 CIts forme de grandes plages troubles. Or dans le cas de certaines mutations (r95, r96 et r99) on observait seulement des plages troubles de cette sorte tandis qu'avec d'autres mutations (r70, r85, r93, r94, r97 et r98) on observait , en plus de ces plages, des petites plages claires environ dix fois plus nombreuses. Donc, dans certains cas, on n'obtenait pas seulement des recombinants de type λ imm21 CIts. Dans un des cas, celui du mutant λ N7 N53 CI857 r94, l'un des bactériophages recombinants qui forment une petite plage claire a été réisolé et étudié. Il apparut que ce recombinant a l'immunité de 21 et ne forme pas de plages à basse température (30°C). Pour localiser la mutation qui confère la cryosensibilité nous avons croisé le recombinant avec deux bactéries lysogènes pour le prophage λ N7 N53 CI857 porteuses de délétions, ΔX3 et ΔX6 (figure 10). Des particules formant des plages à 30°C étaient produites dans le cas de la délétion ΔX3 mais pas dans le cas de la délétion ΔX6. Ces résultats suggèrent que la mutation cryosensible est localisée dans la région rep et permettent de penser que le recombinant étudié a pour génotype λ imm21 CIts r94. Il a été nommé λ imm21 rep.

Un résultat semblable a été obtenu en croisant le même mutant rep, λ N7 N53 CI857 r94, avec le bactériophage λ O29 P3. A 37°C, en plus de recombinants qui forment des plages troubles, d'autres qui forment de très petites plages claires ont été observés. L'un d'eux a été réisolé et étudié. Il ne forme pas de plages à 30°C. Là aussi, il y a production de particules formant des plages à 30°C, quand on croise le recombinant avec la souche porteuse

de la délétion ΔX3 mais pas avec la souche porteuse de la délétion ΔX6. Ces résultats suggèrent que la mutation cryosensible est localisée dans la région rep et permettent de penser que le recombinant étudié a pour génotype λ r94. Il a été nommé λ rep.

§ 2. Fréquence de réversion des mutants rep.

Les bactériophages λ N7 N53 CI857 rep peuvent être obtenus à l'état de particules virales (chapitre précédent), mais ne peuvent pas former de plages de lyse. Afin d'avoir une indication sur la fréquence de réversion pour le caractère défectif de la mutation rep, des stocks de λ N7 N53 CI857 rep de titres équivalents, évalués comme décrit plus haut, sont étalés à 42°C sur la souche indicatrice su C600. La fréquence d'apparition des réverses, quoique variable d'une expérience à l'autre, est à peu près 1000 fois plus faible avec certains mutants (r95, r96 et r99: environ 10^{-7}) qu'avec les autres étudiés (r93 et r94: environ 10^{-4}).

§ 3. Recombinaison entre mutants rep.

Nous avons vu que toutes les mutations rep se localisent entre les marqueurs CII et O. L'analyse génétique devait permettre d'aller plus loin et de donner des indications sur les positions relatives des mutations rep les unes par rapport aux autres. Il fallait voir pour chacune d'entre elles avec quelles autres mutations rep elle recombine.

Pour croiser deux à deux les mutants rep, qui sont initialement obtenus à l'état de prophages défectifs non conditionnels, nous avons tiré parti du fait que l'on peut obtenir des stocks de ces bactériophages mutants à l'état de particules virales (chapitre précédent). Une série de dérivées su de bactéries lysogènes pour des prophages mutants rep ont été surinfectées par une série de bactériophages mutants rep (tableau 20). La recombinaison est jugée d'après le nombre de bactériophages produits capables de former des plages de lyse. Il apparait que les mutations rep utilisées (r70, r85, r93, r94, r95, r96, r97, r98 et r99) peuvent être rangées en deux classes telles que chacune des 9 mutations ne recombine avec aucune des mutations de la même classe. Les mutations r95, r96 et r99 appartiennent à l'une des classes, les mutations r70, r85, r93, r94, r97 et r98 à l'autre.

§ 4. Discussion. Classes repA et repB.

Les résultats précédents ont montré que les mutations de deux classes définies d'après les deux propriétés étudiées d'abord (recombinants obtenus avec λ imm21 et fréquence de réversion) peuvent être rangées d'après l'analyse génétique dans les mêmes deux classes que nous désignerons repA et repB. Pour expliquer les propriétés des recombinants λ imm21 repB, nous proposons qu'à 37°C une mutation repB bloque seulement partiellement la réplication d'où les petites plages que l'on peut détecter à cette température lorsque la mutation est portée par le bactériophage λ imm21 ou λ. Ces plages seraient visibles dans le cas de ces bactériophages, et non dans le cas de λ N7 N53 CI857 repB, peut-être à cause de conditions

Tableau 20. Croisements entre mutants rep.

Bactériophage surinfectant	recombinants rep$^+$ produits dans les croisements									
	avec les bactéries su(λ N7 N53 CI857 rep)									avec ΔM25su
	r99	r98	r97	r96	r95	r94	r93	r85	r70	
λ N7 N53 CI857 r99	0	0	0	0	0	13	1	2	1	1100
λ N7 N53 CI857 r98	0	0	0	1900	11	0	0	4	0	442
λ N7 N53 CI857 r97	0	0	0	1125	5	0	0	0	0	399
λ N7 N53 CI857 r96	1	310	568	1	0	351	4000	520	302	1030
λ N7 N53 CI857 r95	0	40	30	1	0	640	118	6	104	900
λ N7 N53 CI857 r94	57	0	0	4450	200	0	0	0	0	1000
λ N7 N53 CI857 r93	1	0	0	800	3	0	0	0	0	380

Un volume de bactéries lysogènes (2.10^8 particules / ml) est mélangé à un même volume de stock de bactériophage. Après 15 min d'adsorption à 33°C, les bactéries sont diluées 100 fois et agitées 60 min à 42°C. Du chloroforme est ajouté et 0,1 ml des lysats sont étalés à 37°C sur la souche indicatrice su C600. Le nombre de plages observées dans chaque cas est indiqué sur le tableau.

favorables pour la transcription de la région rep O P. A 30°C le caractère défectif des mutants repB serait accentué, soit parce que le caractère défectif des mutations repB elles-mêmes est accentué à 30°C, soit simplement parce que la présence des mutations repB, qui sont déjà partiellement défectives, révèle l'effet de la température sur un autre facteur intervenant dans la multiplication qui fonctionnerait moins bien à 30°C. Cette dernière alternative parait la plus probable puisque tous les mutants repB paraissent cryosensibles.

Quant aux mutations repA elles seraient telles que, même portées par le bactériophage λ imm21 elles conservent leur caractère défectif absolu.

Enfin, les classes de mutations définies d'après les propriétés des mutations étant les mêmes que celles définies d'après l'analyse génétique, nous proposons que la région rep se divise en deux sous-régions, les propriétés d'une mutation rep ne dépendant pas tellement de la nature de la mutation mais surtout de sa position topologique, suivant qu'elle est dans une sous-région ou dans une autre.

Chapitre 5 : Etude de la réversion d'une mutation rep.

§ 1. Isolement d'un bactériophage réverse (nommé λ N rep lic). Propriétés de ce bactériophage.

A partir d'un stock du bactériophage λ N7 N53 CI857 r94 (classe repB) on peut isoler des particules qui forment

des plages à 42°C sur la souche indicatrice su C600. L'une d'elles a été désignée λ N7 N53 CI857 r94 lic16, ou λNrep lic. Cette particule doit porter une mutation additionnelle (lic) qui permet au bactériophage rep de former des plages et ne doit pas résulter d'une réversion vraie de la mutation rep car le bactériophage réverse obtenu n'a pas les propriétés du bactériophage parental λ N7 N53 CI857:

- Le bactériophage réverse λ N7 N53 CI857 r94 lic16 forme des plages de lyse à 37°C sur la souche indicatrice C600 légèrement plus petites que celles formées par λ N7 N53 CI857. De plus il n'en forme pas à 30°C alors que λ N7 N53 CI857 en forme des petites (nous avons d'ailleurs pu isoler à partir des bactériophages rep des particules qui forment des plages à 30°C et dans ce cas les bactériophages obtenus ont les mêmes propriétés que le bactériophage parental λ N7 N53 CI857 comme s'il s'agit cette fois de vrais réverses).

- Inséré comme prophage dans une bactérie hôte qui ne porte pas de suppresseur, donc en l'absence du produit N, le bactériophage réverse λ N7 N53 CI857 r94 lic16 n'a pas d'effet létal après induction.

- Une bactérie qui ne porte pas de suppresseur, lysogène pour le bactériophage réverse λ N7 N53 CI857 r94 lic16 et cultivée à 42°C pendant plusieurs générations récupère rapidement l'immunité lorsqu'elle est ensuite cultivée à 30°C.

- Dans le cas du bactériophage réverse λ N7 N53 CI857 r94 lic16, les aires de lyse formées par des gouttes de bactériophages déposés sur la souche indicatrice su C600, sont claires à 42°C et troubles à 37°C tandis qu'elles sont claires à ces deux températures dans le cas du bactériophage parental λ N7 N53 CI857.

Afin de comprendre les nombreuses propriétés du bactériophage réverse λ N7 N53 CI857 r94 lic16 il fallait savoir à quelle mutation chacune de ces propriétés correspond. Pour cela nous avons essayé de construire par croisement un bactériophage qui contienne la mutation lic mais ne contienne plus la mutation rep.

§ 2. Croisement "en retour" du bactériophage λ N rep lic avec des souches lysogènes. Isolement d'un recombinant nommé λ N lic.

De même que le bactériophage λ imm21 rep, pour lequel nous avons proposé le génotype λ imm21 CIts r94 (chapitre précédent), le bactériophage réverse λ N7 N53 CI857 r94 lic16 ne peut pas former de plages de lyse à 30°C tandis qu'il le peut à 37°C. Nous avons supposé qu'ici encore c'est la mutation r94 qui confère le caractère cryosensible. Aussi, pour essayer de construire un bactériophage qui contienne la mutation lic mais ne contienne pas la mutation rep, nous avons cherché un recombinant qui ne soit pas cryosensible. Le bactériophage réverse λ N7 N53 CI857 r94 lic16 a été croisé avec des bactéries lysogènes pour le prophage parental λ N7 N53 CI857 porteuses de délétions enlevant une partie du prophage mais pas la région rep, ΔM25, ΔX3, ΔX8 (figure 10), et les lysats ont été étalés sur la souche indicatrice su C600 à 33°C. Dans le cas de la souche porteuse de la délétion ΔM25 les bactériophages obtenus sont de deux types également fréquents (environ 5/10 000) : les uns forment des petites plages à 30°C et ne semblent pas différer du bactériophage parental λ N7 N53 CI857

mais les autres forment des grandes plages à 30°C. Dans le cas des souches porteuses des délétions ΔX3 et ΔX8 les bactériophages obtenus (environ 1/1000) forment tous des grandes plages à 30°C. L'un de ces bactériophages a été nommé λ N lic. Il n'est pas exclus qu'il s'agisse, non pas d'un recombinant rep$^+$ lic, mais d'un mutant réverse vrai de la mutation rep, donc aussi de génotype rep$^+$ lic.

§ 3. Propriétés du bactériophage λ N lic.

Le bactériophage λ N lic étant un dérivé non cryosensible de λ N7 N53 CI857 r94 lic16, nous proposons qu'il a pour génotype λ N7 N53 CI857 lic16. Ses propriétés ont été examinées:

- Il forme des grandes plages troubles à 30°C.
- Inséré comme prophage dans une bactérie hôte W3350 qui ne porte pas de suppresseur, donc en l'absence du produit N, il tue la bactérie après induction. Nous avons isolé un survivant à 42°C; il semble porter une mutation additionnelle O du prophage et nous l'avons nommé W3350(λ N lic O).
- Les bactéries lysogènes de type W3350(λ N lic O) cultivées à 42°C pendant plusieurs générations récupèrent rapidement l'immunité, et d'ailleurs aussi la restriction au bactériophage T4 rII, lorsqu'elles sont ensuite cultivées à 30°C (comportement particulier pour une souche lysogène pour un prophage N O).
- Les aires de lyse formées par des gouttes de bactériophages λ N lic déposés sur la souche indicatrice C600 sont claires à 42°C mais troubles à 37°C.

Le bactériophage λ N rep lic avait aussi ces deux dernières propriétés qui résultent donc probablement de la mutation lic.

§ 4. Construction par recombinaison d'un bactériophage nommé λ rep lic.

A partir du bactériophage λ N rep lic, nous nous sommes précédemment attachés à construire un recombinant qui ne porte plus la mutation rep. Nous avons ensuite voulu construire un recombinant qui ne porte plus les mutations N.

Le bactériophage λ N7 N53 CI857 r94 lic16 a été croisé avec le bactériophage λ imm434 CI O29 P3 (figure 13) et, parmi les bactériophages qui formaient des plages sur la souche indicatrice W3350 qui ne porte pas de suppresseur, à 42°C (environ 1/10 000), trois ont été étudiés. Un de ces bactériophages, d'immunité 434, forme des plages à 42°C et à 30°C. Nous proposons qu'il s'agit d'un recombinant λ imm434 CI. Un autre, d'immunité 434 aussi, forme des plages à 42°C mais pas à 30°C. Nous proposons qu'il s'agit d'un recombinant λ imm434 CI r94 (ou λ imm434 CI r94 lic16). Le dernier enfin est d'immunité λ et forme des plages à 42°C mais pas à 30°C. Nous proposons qu'il s'agit d'un recombinant λ CI857 r94 lic16 et il a été nommé λ rep lic. Nous verrons que les propriétés de ce bactériophage indiquent bien qu'il contient le marqueur rep et le marqueur lic. Notons que les croisements réalisés dans ce travail n'ont pas permis de localiser la mutation lic.

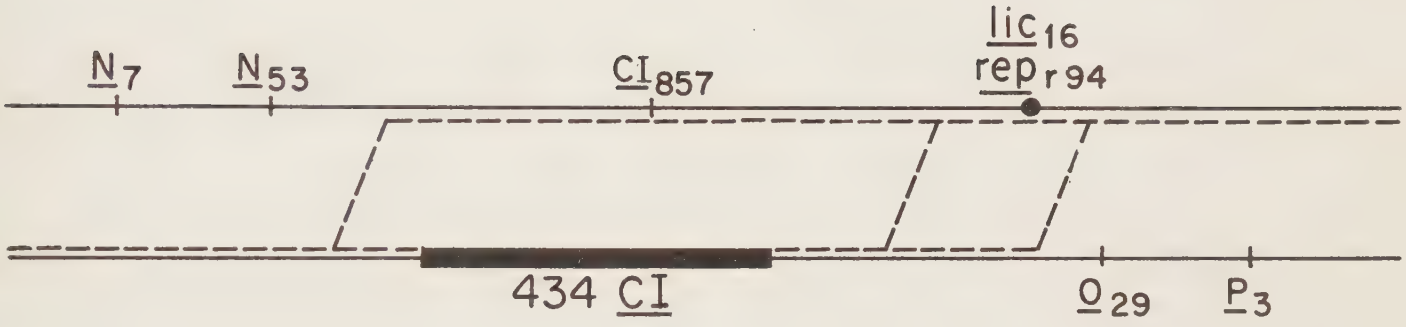


Figure 13: Construction du bactériophage λ rep lic.

§ 5. Propriétés du bactériophage λ rep lic.

Le bactériophage λ rep lic ne forme pas de plages de lyse à 30°C. Pour localiser la mutation qui confère la crysosensibilité, nous avons croisé ce bactériophage avec deux bactéries lysogènes pour le prophage λ N7 N53 CI857 porteuses des délétions ΔX3 et ΔX6 (figure 10). Des recombinants formant des plages à 30°C étaient produits dans le cas de la délétion ΔX3 mais pas dans le cas de la délétion ΔX6. On peut donc penser que le bactériophage porte une mutation dans la région rep.

Le bactériophage λ rep lic a ensuite été croisé avec la bactérie lysogène pour λ N7 N53 CI857 porteuse de la délétion ΔM25 (figure 10) et le lysat a été étalé à 30°C sur la souche indicatrice su C600. On attend que les bactériophages qui forment des plages à cette température ne portent plus la mutation rep. 135 bactériophages ont été isolés et étudiés. 22 portaient les mutations N et nous supposons qu'il s'agit de recombinants entre λ rep lic et le prophage N de la souche qui porte la délétion ΔM25. Pour 4 d'entre eux les aires de lyse, formées par des gouttes de bactériophages déposés sur la souche indicatrice C600, sont claires à 42°C et troubles à 37°C tandis qu'avec les 18 autres elles sont claires aux deux températures. Nous proposons que les 4 bactériophages ont recombiné pour la mutation lic16, ce qui montrerait que le bactériophage λ rep lic porte bien la mutation lic. Les 18 autres seraient λ N7 N53 CI857 (plages claires dès 37°C).

§ 6. Questions soulevées par l'existence d'une mutation particulière de λ localisée entre les marqueurs CII et O.

Nous avons vu que la région rep se situe entre les extrémités des délétions ΔM25, ΔF3 et à droite de

la région imm21, c'est à dire entre les gènes CII et O (figure 10). Oppenheim (communication personnelle) a isolé des mutants du bactériophage λ qui sont, au moins formellement, "sensibles à cro": ces mutants se multiplient sur la souche induite W3350(λ N7 N53 CI857 cro ONQ8) de Eisen, Brachet, Pereira da Silva et Jacob (1970) mais pas sur la souche W3350(λ N7 N53 CI857 ONQ8) correspondante. Or la mutation qui confère la sensibilité a été localisée par Oppenheim (communication personnelle) entre les marqueurs CII et O, et plus précisement d'une part à droite de la région imm21 et d'autre part entre les extrémités des délétions ΔX3 et ΔF3. Ceci oblige à supposer qu'il existe un espace entre la région imm21 et l'extrémité de la délétion ΔF3 (figure 14).

Les résultats d'un croisement montrant que la délétion ΔF3 ne recouvre effectivement pas la région imm21 sont présentés dans le tableau 21. Ainsi les mutations qui confèrent la sensiblité recombinent avec la souche qui porte la délétion ΔF3 et doivent donc se situer à gauche de l'extrémité de cette délétion, tandis que les mutations rep ne recombinent pas avec la souche qui porte la délétion ΔF3 et doivent donc se situer à droite de l'extrémité de cette délétion. Quoiqu'on ne puisse exclure que les mutations rep soient de petites délétions (limitées en taille d'après les résultats de mesure de densité du chapitre 3) qui chevauchent l'extrémité de la délétion ΔF3, on peut penser que le site de sensibilité et les mutations rep sont simplement localisées dans deux régions très voisines sur le chromosome de λ, entre les marqueurs CII et O.

La proximité des deux sortes de mutations permet de demander si les mutants rep ne seraient pas eux aussi, là encore au moins formellement, "sensible à cro".

Tableau 21. Position relative de divers marqueurs de la région CII O.

Bactériophage surinfectant	Nombre de plages par bactérie infectée		
	souche ΔH1su	souche ΔF3su	souche ΔM25su
λ CI857 O29	3.10^{-5}	2.10^{-6}	3.10^{-2}
λ imm21	10^{-6}	$1,2.10^{-3}$	8.10^{-3}
λ N7 N53 CI857 r99	10^{-6}	10^{-6}	2.10^{-3}
λ N7 N53 CI857 r97	5.10^{-5}	10^{-5}	6.10^{-4}
λ N7 N53 CI857 r96	4.10^{-6}	10^{-6}	$1,3.10^{-3}$
λ N7 N53 CI857 r94	5.10^{-5}	5.10^{-6}	9.10^{-4}

Les résultats indiqués sur la première ligne correspondent à des étalements sur la souche indicatrice W3350 qui ne porte pas de suppresseur; ceux de la deuxième ligne sur la souche lysogène C600(λ imm21) et ceux des quatre lignes suivantes sur la souche su C600. Les étalements sont tous faits à 38°C.

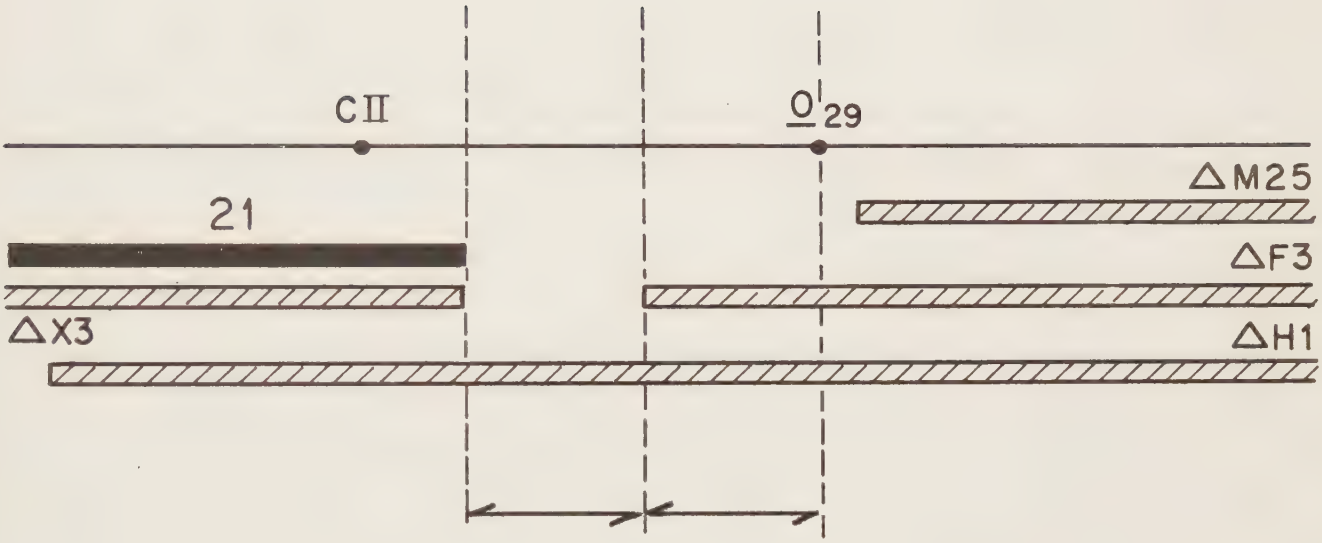


Figure 14: Localisation de deux régions entre les marqueurs CII et O.

§ 7. Sensibilité particulière du bactériophage λ rep lic chez certaines bactéries lysogènes.

Nous voulions savoir si un mutant rep était sensible à cro. Des expériences ont été réalisées avec le bactériophage λ rep lic qui porte la mutation rep et qui peut faire des plages de lyse.

Nous avons mesuré l'efficacité d'étalement du bactériophage λ rep lic sur différentes souches lysogènes de type cro$^+$ ou cro (tableau 22 - début). Les résultats indiquent que λ rep lic ne se multiplie pas sur les souches qui produisent cro.

Nous avons ensuite mesuré l'efficacité d'étalement du bactériophage λ rep lic sur différentes souches lysogènes pour des prophages rep, rep lic et lic. Les résultats (tableau 22 - fin) indiquent que λ rep lic ne se multiplie pas sur la souche lic, ni sur certaines souches rep mais peut se multiplier sur la plupart des souches rep lic et sur certaines souches rep. De plus il semble que les souches rep sur lesquelles le bactériophage λ rep lic (de type repB) peut se multiplier sont celles de la classe repA.

§ 8. Discussion.

Nous avons obtenu des réverses des mutants rep dont les propriétés sont très différentes de celles du bactériophage initial rep$^+$. Aussi nous avons supposé que le mutant réverse, dérivé de λ N rep, portait une

Tableau 22. Etalement du bactériophage [illegible] sur diverses lysogènes.

Souche indicatrice	efficacité d'étalement à 42°C de	
	λ CI857 r94(repB) lic16	λ CI857
W3350	1	1
W3350(λ N CIts ONQ8)	1/1000	1
W3350(λ N CIts cro ONQ8)	1 (mini plages)	1
W3350(λ N CIts P3)	moins de 1/1000	1
W3350(λ N CIts x13)	1/100	1
152 (λ N CIts r94) (=repB)	moins de 1/1000	1
152 (λ N CIts r96) (=repA)	1	1
M72 (λ N CIts r93) (=repB)	1 (mini plages)	1
M72 (λ N CIts r94) (=repB)	1/100(mini plages)	1
M72 (λ N CIts r95) (=repA)	1	1
M72 (λ N CIts r96) (=repA)	1	1
M72 (λ N CIts r97) (=repB)	1/10(mini plages)	1
M72 (λ N CIts r98) (=repB)	1/10(mini plages)	1
M72 (λ N CIts r99) (=repA)	1/10	1
W3350(λ N CIts r94 lic16) (=repB lic)	1 (mini plages)	1
W3350(λ N CIts r97 lic12) (=repB lic)	1	1
W3350(λ N CIts r98 lic13) (=repB lic)	1	1
W3350(λ N CIts lic16 O)	1/1000	1

Les bactéries lysogènes sont cultivées à 40°C pendant plusieurs générations puis étalées en surcouche. Des gouttes de plusieurs dilutions des bactériophages CI857 r94 lic16 et CI857 sont déposées, puis les boites sont incubées à 40°C pendant une nuit.

nouvelle mutation et il a été nommé λ N rep lic.

Soulignons une première propriété du bactériophage λ N rep lic: inséré comme prohage d'une bactérie qui ne porte pas de suppresseur, donc en l'absence du produit N, il n'a pas d'effet létal sur la bactérie hôte. Ceci est étonnant car on suppose généralement que c'est la réplication du DNA du prophage qui cause l'effet létal or le bactériophage λ N rep lic, pouvant faire des plages sur une bactérie su, est donc capable, au moins dans ces conditions, de répliquer son DNA. Nous avons rencontré cependant une situation analogue dans deux cas: celui des mutants rA et celui des mutants rB qui n'ont pas d'effet létal et qui peuvent se multiplier dans une souche su. Ces propriétés s'expliquaient du fait que pour les mutants rA la réplication n'est possible qu'en présence du produit du gène N et que pour les mutants rB le système de réplication semble modifié de telle sorte qu'il n'y a plus l'effet létal. Nous ne savons pas dans le cas du bactériophage λ N rep lic si l'une des deux explications précédentes s'applique.

Les propriétés les plus innattendues du bactériophage λ N rep lic restent les modifications qu'il semble avoir dans le système de régulation de la synthèse du répresseur CI. En effet le bactériophage λ N rep lic récupère rapidement l'immunité quand l'hôte est cultivé à 30°C et a en cela le même phénotype qu'un mutant cro (Eisen, Brachet, Pereira da Silva et Jacob 1970). La mutation lic, qui a été séparée de la mutation rep, parait responsable de ce phénotype. Dans le même temps le bactériophage λ N lic est capable de faire des plages à 30°C et diffère en cela d'un mutant cro. On peut alors suggérer que

la mutation lic est:

* soit une mutation particulière du gène cro assez différente des mutations cro connues jusqu'à présent

* soit d'un type nouveau et que, par exemple, elle crée un site promoteur, quelque part dans la région x rep O P, qui conduit à une transcription allant de droite à gauche. Cette transcription activerait le réplicateur muté rep en même temps qu'elle activerait la synthèse du répresseur CI.

De toute manière il est surprenant qu'en cherchant un mutant réverse d'un mutant de REPLICATION du DNA on trouve un mutant de REGULATION du système CI et cette relation doit avoir un caractère général car des bactériophages réverses de différents mutants rep ont été isolés λ N7 N53 CI857 r93 lic17, λ N7 N53 CI857 r97 lic12, λ N7 N53 CI857 r98 lic13 et tous récupèrent rapidement l'immunité.

Nous avons aussi (paragraphes 6 et 7) vu que le bactériophage λ rep lic ne peut pas se multiplier sur certaines souches lysogènes. Quoique les résultats paraissent trop préliminaires pour conduire à une interprétation, on peut néanmoins proposer déjà quelques schémas. Ainsi le mutant rep lic ayant un phénotype très semblable à celui des mutants "formellement cro-sensibles", dont les mutations sont localisées très près des mutations rep, on peut penser que c'est la mutation rep qui fait apparaitre la "sensibilité à cro" et qu'il s'agirait dans les deux cas de deux aspects d'un même phénomène. La "sensibilité à cro" de la mutation rep expliquerait pourquoi les mutations lic, qui sont sélectionnées comme réverses des rep, ont certaines des propriétés des mutants cro (récupération de l'immunité): seules auraient été sélectionnées les mutations lic dont l'un des effets

était de faire faire peu de cro, ou de synthétiser un cro peu actif, pour ne pas bloquer la réplication du génome qui porte toujours la mutation rep. Les propriétés de "sensibilité à cro" des mutants rep lic pourraient être un nouvel aspect de la relation suggérée plus haut entre la REPLICATION et la REGULATION du système CI chez λ.

D'après Oppenheim les mutants "sensibles à cro" seraient plutôt "dépendant du produit N (ou d'un produit dont la synthèse nécessite le produit N)" car la présence en cis de la mutation v2 (constitutive pour N) fait disparaitre le phénotype mutant (communication personnelle). Si les mutants rep lic, redevenus capables de répliquer en présence du produit N, sont très "dépendants du produit N (ou d'un produit dont la synthèse nécessite le produit N)", ceci expliquerait pourquoi les bactériophages λ N rep lic ne tuent pas les hôtes qui ne portent pas de suppresseur (en l'absence du produit N ils ne se répliqueraient pas).

La raison pour laquelle le bactériophage λ rep lic parait pouvoir se répliquer dans les souches repA n'est pas apparente. De toute manière, ce résultat est un argument supplémentaire pour distinguer la classe repA de la classe repB.

V DISCUSSION GENERALE.

Nous avions choisi le bactériophage λ pour étudier la régulation de la réplication du DNA en cherchant à mettre en évidence par des méthodes génétiques les différents éléments d'un réplicon: l'(les) initiateur(s) protéique(s) et le site réplicateur.

Quant aux initiateurs du réplicon viral les fonctions remplies par les produits des gènes O et P semblent en posséder toutes les propriétés exigées. Lorsque nous avons commencé ce travail l'existence d'un troisième initiateur pouvait toujours être envisagée; pourtant l'étude commencée par Eisen, Pereira da Silva et Jacob (1968) des dérivés d'un prophage λ N qui ont perdu leur effet létal après induction, n'a jamais abouti à mettre en évidence un initiateur supplémentaire. Notre travail qui continuait la recherche entamée par ces auteurs n'a pas davantage permis d'identifier de nouvelles protéines virales de réplication. Calef et Neubauer (1968) avaient pourtant présenté un mutant du prophage λ N qui paraissait O^+ P^+ et sans effet létal. Ces auteurs avaient alors proposé (Neubauer et Calef 1970) l'existence d'une troisième protéine de réplication appelée Z et dont le gène était localisé dans la région CII. Cette hypothèse n'est pas nécessaire: les mutations peuvent être de type rA car le caractère O^+ P^+ n'a été révèlé que par des complémentations avec des bactériophages λ imm434 O et λ imm434 P (Neubauer et Calef 1970) qui apportent le produit N et nous avons vu que ce produit corrige l'effet des mutations rA. Rappelons au passage comment ces mutations rA rendent N-dépendante l'expression des fonctions O et P. Elles semblent être des insertions à effet polaire, semblables à d'autres mutations qui avaient été obtenues dans l'opéron

gal d' E.coli ,et donc d'un caractère assez général comme nous l'avons noté et discuté. Mais la N-dépendance conférée par ces insertions dans le cas du bactériophage λ n'est pas une propriété spécifique des mutations rA. Elle s'explique par une stimulation de la transcription de la région O P due à la présence du produit N, stimulation qui existerait toujours chez le bactériophage λ et que nous avons été amenés à mettre en évidence par des mesures de complémentation. Cette nouvelle régulation reconnue chez le bactériophage λ dépend de l'immunité: la stimulation n'a pas lieu en présence du répresseur (Thomas 1966). Si le produit du gène N agissait à la manière d'un facteur σ en provoquant la transcription il faudrait admettre que ce déclenchement n'a lieu qu'après que l'immunité a été levée, mais on peut aussi penser que le produit N, plutôt que de provoquer la transcription, la prolonge et agit comme une sorte d'anti-ρ. Ce type d'action est précisément celui reconnu jusqu'alors pour le produit N (Roberts 1969).

Quant au point de départ de la réplication, les données génétiques s'étaient accumulées peu à peu mais conduisaient en 1968 à une image assez confuse du réplicateur du bactériophage λ. En effet la mutation t5 du bactériophage λ était la seule connue qui semblât altérer directement le réplicateur. Or il s'agissait d'une mutation O. Ainsi on pouvait penser que le gène réplicateur n'était pas seulement une séquence dont la fonction serait d'être l'origine de la réplication, mais constituait aussi un élément du gène O. Il paraissait possible aussi que la mutation t5, agissant par exemple par l'intermédiaire de la fonction O pour bloquer de façon non complémentable la réplication, ne soit pas au site réplicateur. Nous avons vu dans l'introduction que les effets du répresseur

CI et des mutations polaires de x sur la réplication s'expliquaient bien suivant l'hypothèse que dans la région x O P se trouve le réplicateur du bactériophage λ. Enfin divers auteurs avaient localisé directement le point de départ de la réplication par l'étude du DNA de bactériophages λ marqués en début de réplication (Lepecq et Baldwin 1968, Makover 1968, Tomizawa et Ogawa 1968); mais les résultats de ces expériences ne conduisaient qu'à une localisation très peu précise: dans la moitié droite du chromosome du bactériophage. Les mutations rC empêchent la réplication, elles sont cis-dominantes et n'altèrent pas l'expression des fonctions O et P. Elles semblent donc modifier le seul gène réplicateur. Leur localisation entre les gènes CII et O s'accorde avec d'autres résultats sur le point de départ de la réplication du bactériophage λ qui se sont récemment accumulés. Ainsi (Dove, Inokuchi et Stevens 1971) le mutant t5 porterait deux mutations, une située dans le gène O et une autre située entre les gènes CII et O à caractère défectif. Le même auteur a obtenu des mutations, nommées ti, qui, tout en permettant la formation de plages de lyse, altèreraient légèrement le réplicateur et qui sont localisées entre les gènes CII et O. Par ailleurs des images par microscopie électronique de molécules de DNA de bactériophages λ en réplication, suggèrent que la réplication est déclenchée à partir d'un site proche du gène O (et dans deux directions opposées) (Schnös et Inman 1970). Une autre étude s'est encore ajoutée qui localise un site essentiel pour la réplication entre les gènes CII et O: Stevens, Adhya et Szybalski (1971) montrent que la réplication, mesurée par des hybridations avec des RNA connus et dans un système où les fonctions réplicatives O et P sont apportées,

peut se faire sur certaines délétions du prophage λ: à condition que ces délétions ne recouvrent pas la région située entre les gènes CII et C

Les mutants rC nous ont permis de commencer l'étude génétique de cette région que nous appelons rep. Ainsi nous avons distingué deux zones repA et repB, auxquelles correspondent deux classes différentes de mutants rep. Nous ne connaissons pas le rôle de ces deux zones (point d'attachement du DNA à un site membranaire, point où le système de polymérisation agit... par exemple) mais la répartition des mutants en deux classes a été confirmée par l'étude d'une propriété d'un mutant réverse de repB. Celui-ci, repB lic, peut se multiplier sur une bactérie induite lysogène pour un prophage repA mais ne le peut pas sur des bactéries lysogènes pour un prophage repB ni sur la plupart des bactéries lysogènes essayées. Il semble aussi que le produit cro ait un effet dans cette inhibition, comme si le bactériophage était "cro-sensible". De plus les mutations lic ressemblent par certains aspects aux mutations cro. Enfin de nouvelles mutations du bactériophage λ le rendant "cro-sensible" ont été isolées et localisées près de rep (Oppenheim, communication personnelle). De ceci, nous proposons que d'une part il existe une intéraction entre la réplication du DNA du bactériophage λ et la régulation du système CI et que d'autre part les mutants repB et repA ont des propriétés très différentes vis à vis de cette régulation: par exemple, les mutants repB iraient s'attacher à un site de réplication bactérien, en compétition avec les bactériophages repB lic, tandis que les mutants repA auraient perdu l'affinité pour ce site.

Aux trois classes déjà connues de mutants de réplication du bactériophage λ, les classes O, P et x s'ajoutent

maintenant les classes rA et rC(ou rep). Obtenue par la même sélection, la troisième classe, rB, semble très différente. En effet, nous avons montré que les bactériophages de la classe B, qui ne tuent pas la bactérie hôte lorsqu'ils sont intégrés puis induits, continuent cependant de pouvoir se répliquer en absence du produit N, au moins comme plasmides. Or jusqu'à présent (Eisen, Pereira da Silva et Jacob 1968) on considérait que la réplication d'un prophage intégré causait la mort de la bactérie hôte. Chez les mutants de la classe B, la réplication semble altérée et n'est plus létale. Ph. Brachet (Communication personnelle) en étudiant l'une des mutations de la classe B, la mutation r77, a trouvé d'une part qu'elle est de type π (voir note) et d'autre part que plusieurs mutants λ N π n'ont plus d'effet létal lorsqu'ils sont induits comme prophages. Il s'agit donc finalement d'une propriété inattendue de certaines mutations π. Il s'agit peut-être d'une différence qualitative dans l'intéraction entre le bactériophage λ et le système de réplication du DNA bactérien comme le suggéreraient les propriétés des mutations π (voir note), mais la réplication virale peut être aussi simplement diminuée quantitativement pour devenir compatible avec la réplication bactérienne.

Cependant l'étude de la mécanique de la mise en route de la réplication ne pourra plus beaucoup avancer tant que l'on ne comprendra pas les fonctions biochimiques de O et P. Il sera sans doute nécessaire d'isoler ces produits et de trouver des conditons permettant l'étude in vitro. Déjà tous les éléments structuraux annoncés dans le modèle du réplicon ont pu être identifiés génétiquement

Note: Les mutations π sont des mutations du gène P du bactériophage λ qui permettent la croissance du bactériophage sur certaines souches DNAB à 37°C dans lesquelles le bactériophage sauvage ne peut se multiplier à 37°C (Georgopoulos et Herskowitz 1971).

et apparaissent localisés dans une même région. Grâce à la procédure présentée dans ce travail il est devenu possible d'isoler des mutants du réplicateur et de commencer l'étude génétique de ce gène essentiel, le site promoteur de la réplication mais, là encore, l'étude ne sera complète qu'avec l'approche biochimique et nécessitera peut-être l'isolement du segment réplicateur.

BIBLIOGRAPHIE

Abe M.and J.Tomizawa (1967) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 58, 1911.

Appleyard R.K. (1954) Genetics 39, 429-439.

Baldwin R.L. and E.M.Shooter (1963) J. Mol. Biol. 7, 511.

Brachet Ph. et B.Green (1967) Arch. Int. de Physiologie et de Biochimie 75, 357-359.

Brachet Ph. and R.Thomas (1969) Mutation Res. 7, 257-260.

Brooks K. (1965) Virology 26, 237-239.

Cairns J. (1963) J. Mol. Biol. 6, 208.

Calef E. and Neubauer Z. (1968) Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 32,67.

Campbell A. (1961) Virology 26, 237-239.

Campbell A. et Del Campillo Campbell A. (1963) J. Bact. 85, 1202.

Caro L.G. and C.M.Berg (1968) Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 33, 559.

Couturier M. and C.Dambly (1970) C. R. Acad. Sci. 270, 428-431.

Cuzin F. (1965) Thèse de doctorat.

Dambly C., M.Couturier and R.Thomas (1968) J. Mol. Biol. 32, 67-81.

Dove W.F. (1968) Ann. Rev. Genet. 2, 305-340.

Dove W.F., H.Inokuchi and W.F.Stevens (1971) Cold Spr. Harb. Symp. The bacteriophage lambda, 747.

Eisen H.A., C.Fuerst, L.Siminovitch, R.Thomas, L.Lambert, L.Pereira da Silva and F.Jacob (1966) Virology 30, 224-241.

Eisen H.A., L.Pereira da Silva and F.Jacob (1968) Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 33, 755-764.

Eisen H.A., Ph.Brachet, L.Pereira da Silva and Jacob (1970).

Georgopoulos C.P. and I.Herskowitz (1971) Cold Spr. Harb. Symp. The bacteriophage lambda.

Hirota Y., A.Ryter and F.Jacob (1968) Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 33, 677.

Jacob F. et E.L.Wollman (1954) Ann. Inst. Pasteur 87, 653.

Jacob F., C.Fuerst et E.L.Wollman (1957) Ann. Inst. Pasteur 93, 724.

Jacob F., D.Perrin, C.Sanchez et J.Monod (1960) C.R.Acad.Sci. 250, 1727-1729.

Jacob F. et C.Fuerst (1958) J. Gen. Microbiol. 18, 518.

Jacob F. and J. Monod (1961) J. Mol. Biol. 3, 318-356.

Jacob F. and E.L.Wollman (1961) Sexuality and the genetics of bacteria Acad. Press. Edit. New York.

Jacob F., S.Brenner and F.Cuzin (1963) Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 28, 329.

Jordan E., H.Saedler and P.Starlinger (1968) Molec. Gen. Genetics 102, 353-363.

Kaiser A.D. and F.Jacob (1957) Virology 4, 509-521.

Kaiser A.D. (1957') Virology 3, 42-61.

Kellenberger G., M.L.Zichichi and J.Weigle (1960) Nature 187, 161-162.

Kourilsky Ph., L.Marcaud, P.Sheldrick, D.Luzzati and F.Gros (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. 61,1013-1020.

Lepecq J.B. and R.L. Baldwin (1968) Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 33, 609-620.

Maaloe O. and P.Hanawalt (1961) J. Mol. Biol. 3, 144.

Makover S. (1968) Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 33, 621.

Mallamy M. (1970) Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. The lac operon.

Master M. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. 65, 601.

Matsubara K. and A.D.Kaiser (1968) Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 33, 769.

Meselson M. and F.W.Stahl (1958) Proc. Natl. Acad. Sci. 44, 671.

Neubauer Z. and E.Calef (1970) J. Mol. Biol. 51, 1-13.

Nagata T. and M.Meselson (1968) Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 33, 553.

Ogawa T. and J.Tomizawa (1968) J. Mol. Biol. 38, 217-225.

Packman S. and W.Sly (1968) Virology 34, 778-789.

Pereira da Silva L. and F. Jacob (1968) Ann. Inst. Pasteur 115, 145-158.

Pritchard R.H. and K.G.Lark (1954) J. Mol. Biol. 9, 288.

Ptashne M. and N.Hopkins (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. 60, 1282-1287.

Roberts J. (1969) Nature 224, 1168-1174.

Schnös M. and R.B.Inman (1970) J. Mol. Biol. 51, 61.

Shapiro J. (1969) J. Mol. Biol. 40, 93-105.

Signer E. (1969) Nature 223, 158.

Stevens W.F., S.Adhya and W.Szybalski (1971) Cold spr. Harb. Symp. Quant. Biol. The bacteriophage lambda.

Sussman R. et F.Jacob (1962) C. R. Acad. Sci. 254, 1517-1519.